

***Caracterização do tempo de prateleira durante o desenvolvimento de novos produtos em concentrados líquidos de microalgas para aquacultura***

**Hélia Sofia Pinto Carvalho**

2023

***Caracterização do tempo de prateleira durante o desenvolvimento de novos produtos em concentrados líquidos de microalgas para aquacultura***

**Hélia Sofia Pinto Carvalho**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Relatório de Mestrado realizada sob a orientação da Especialista Teresa Baptista e coorientação da Doutora Patrícia Diogo

2023

## **Caracterização do tempo de prateleira durante o desenvolvimento de novos produtos em concentrados líquidos de microalgas para aquacultura**

### **Declaração de autoria de trabalho**

Eu, Hélia Sofia Pinto Carvalho, declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

### *Copyright*

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

---

À Professora Teresa Baptista, um muito obrigado por todo o carinho, palavras de incentivo e apoio, desde o início desta aventura académica.

À minha orientadora Patricia Diogo, obrigada pela sua participação e colaboração.

Agradeço à Necton S.A, empresa que me acolheu e me tem permitido crescer em todos os sentidos.

Inês Costa, Catarina Anjos, Ana Coelho, Elizabete Gonçalves e Soraia Gonçalves, não poderia deixar de vos dar um agradecimento especial, pelos vários contributos ao longo destes meses.

À minha querida Teresa Lamela, por estar sempre lá, em todos os momentos!

Um especial obrigado à minha família, e um pedido de desculpa, a ti Francisco, por todos os minutos em que te coloquei em “espera”, para que pudesse cumprir os prazos e objetivos, esperando que esta seja mais uma das formas que tenho para te transmitir ensinamentos e valores!

Espero que todos se sintam honrados do meu percurso, nem sempre foi fácil, mas foi mais um desafio concluído!

## Resumo

---

Estima-se que a população mundial irá aumentar rapidamente até 2050, exigindo um aumento significativo da produção alimentar, com uma procura especial de proteínas de alta qualidade. Prevendo-se que a indústria da aquacultura cresça mais 37%, entre 2016 e 2030, e a sua forte dependência de alimentos produzidos a partir de peixes selvagens capturados não seja sustentável.

Torna-se imprescindível o desenvolvimento de soluções inovadoras, por forma a manter o setor da aquacultura económico e ambientalmente sustentável, em conformidade com os principais objetivos de desenvolvimento sustentável, definidos pelas Nações Unidas.

O desenvolvimento de produtos comerciais adaptados às exigências do mercado da aquacultura, nomeadamente formulações de microalgas prontas a utilizar, permitem uma otimização e redução dos custos, associados à nutrição dos cultivos auxiliares, nomeadamente na produção de rotíferos, essencial para a produção de larvas marinhas das principais espécies de peixes produzidas em aquacultura.

Os produtos em estudo, foram desenvolvidos de modo a se adaptarem às exigências do mercado da aquacultura, neste caso, uma das formulações encontra-se otimizada para a “técnica de água verde” e produção de rotíferos em sistema de *batch* (fórmula A) e a outra para sistemas intensivos (semi-contínuo), como é o caso do sistema *Recirculating aquaculture systems* (RAS) (fórmula B).

Os produtos desenvolvidos deverão ser devidamente validados, quer em termos da caracterização bioquímica, microbiológica, quer ao nível das características sensoriais, tais como a cor e o aspeto, considerando-se essencial a estabilidade destas ao longo de todo o período de armazenamento e conservação, vulgarmente designado por tempo de prateleira (*shelf-life*).

Através do presente estágio foi possível efetuar a caracterização do tempo de prateleira de 2 produtos/formulações concentradas líquidas de microalgas da espécie *Nannochloropsis sp.*, através da avaliação de um conjunto de parâmetros, nomeadamente análise sensorial, microbiológica e bioquímica, de forma a efetuar a caracterização e investigação das possíveis

alterações que possam comprometer o prazo de validade, quer primário quer secundário definido pela empresa.

**Palavras-chave:** Aquacultura, rotíferos, microalgas, concentrados líquidos, tempo de prateleira

## Abstract

---

It is estimated that the world's population will increase rapidly by 2050, requiring a significant increase in food production, with a particular demand for high-quality proteins. The aquaculture industry is expected to grow by a further 37 per cent between 2016 and 2030, and its heavy dependence on food produced from wild caught fish is not sustainable.

It is essential to develop innovative solutions in order to keep the aquaculture sector economically and environmentally sustainable, in line with the main sustainable development goals defined by the United Nations.

The development of commercial products adapted to the demands of the aquaculture market, namely formulations of *ready-to-use* microalgae, allows for the optimization and reduction of costs associated with the nutrition of auxiliary crops, namely in the production of rotifers, which is essential for the production of marine larvae of the main fish species produced in aquaculture.

The products under study have been developed to adapt to the demands of the aquaculture market, in this case, one of the formulations is optimized for the "green water technique" and rotifer production in batch systems (formula A) and the other in intensive (semi-continuous) systems, such as the Recirculation Aquaculture System (RAS) (formula B).

The products developed will have to be properly validated, both in terms of biochemical and microbiological characterization and in terms of sensory characteristics, such as color and appearance, considering that their stability throughout the storage and conservation period, commonly known as shelf-life, is essential.

Through this internship, it was possible to characterize the shelf-life of 2 liquid concentrated products/formulations made from microalgae *Nannochloropsis sp.*, by evaluating a set of parameters, namely sensory, microbiological and biochemical analysis, in order to characterize and investigate possible alterations that could compromise the primary and secondary shelf life defined by the company.

Key words: Aquaculture, rotifers, microalgae, liquid concentrates, shelf-life

## Índice

---

Agradecimentos .....	2
Resumo .....	3
Abstract .....	5
Índice de Figuras .....	8
Índice de Tabelas .....	10
Abreviaturas   Glossário .....	11
1. Introdução .....	13
1.1 Cultivo de microalgas .....	14
1.2 Cultivo de rotíferos.....	17
1.3 Breve descrição da empresa Necton, SA.....	19
1.4 Desenvolvimento de novos produtos .....	23
1.5 Tempo de prateleira - metodologia .....	25
1.6 Influência do tempo de armazenamento na validade dos produtos .....	26
1.7 Objetivos .....	27
2. Metodologia.....	29
2.1 Preparação do produto .....	29
2.2 Recolha de amostras .....	30
2.3 Desenho experimental .....	31
2.3.1 Caracterização da composição bioquímica e microbiológica.....	32
2.3.2 Análise sensorial do produto.....	33
2.3.3 Análise de precipitação do produto .....	35
2.4 Análise de dados e estatística .....	36
3. Resultados .....	37
3.1 Caracterização bioquímica e microbiológica.....	37
3.2 Análise sensorial do produto.....	42
3.2.1 Análise sensorial do produto - Cor .....	42
3.2.2 Análise sensorial do produto – Cheiro .....	44
3.2.3 Análise sensorial do produto – Aspetto .....	45
3.3 Análise de precipitação do produto .....	45
4. Discussão .....	49
4.2 Caracterização da composição bioquímica e microbiológica.....	52

4.3 Análise sensorial do produto.....	55
3.2.1 Análise sensorial do produto - Cor .....	55
3.2.2 Análise sensorial do produto – Cheiro .....	57
3.2.3 Análise sensorial do produto – Aspeto .....	58
4.3 Análise de precipitação do produto .....	58
5. Conclusão.....	61
6. Referências bibliográficas.....	64

## Índice de Figuras

---

Figura 1.1 - Evolução do setor da aquacultura, ao longo das últimas décadas, in "The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)", publicada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO; 2022).

Figura 1.2 - Parque Natural da Ria Formosa Natural - Algarve, onde se encontram localizadas as instalações da empresa Necton, S.A.

Figura 1.3 - Unidade de Negócio do Sal, empresa Necton, S.A, com detalhe das zonas produtivas de sal marinho tradicional e flor de sal.

Figura 1.4 – Unidade de Negócio das Algas, empresa Necton, S.A, com detalhe de algumas das tecnologias de produção disponíveis (e.g., cultivo de inóculos de microalgas em meio sólido ou em meio líquido, sistemas de coluna de bolhas ou *airlifts* e sistema de cultivo em grande escala, tais como painéis planos ou *green wall*, *raceway*, fotobiorreactores).

Figura 1.5 - Diminuição da qualidade dos produtos em função do tempo de armazenamento, em função da abertura da embalagem e os respetivos valores de tempo de prateleira primária e secundária. Adaptado de (Nicoli, 2012).

Figura 2.1 – Diagrama resumo das análises realizadas às formulações piloto, desenvolvidas no âmbito da conceção dos dois pontos, assim como os pontos de amostragem.

Figura 2.2 - Escala de cores utilizada para a classificação dos produtos, RAL (in, <https://sthelenswindows.com/colours/ral-greens>)

Figura 3.1 - Caracterização bioquímica, expresso em percentagem de peso seco, nas formulações A (n=22) e B (n=15): A) conteúdo proteico; B) conteúdo lipídico. Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre batches encontram-se representadas através de letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p<0,05$ ).

Figura 3.2 - Caracterização microbiológica, através da quantificação de bactérias mesófilas, nas formulações A (n=23) e B (n=17). Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre batches encontram-se representadas através de letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p<0,05$ ).

Figura 3.3 - Caracterização bioquímica, através da determinação do conteúdo proteico, expresso em percentagem de peso seco, nas formulações A (n=9) e B (n=4), ao longo dos meses de armazenamento em congelação. Os dados representam médias e desvios padrões (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p<0,05$ ).

Figura 3.4 – Caracterização bioquímica, através da determinação do conteúdo lipídico, expresso em percentagem de peso seco, nas formulações A (n=9) e B (n=4), ao longo dos meses de armazenamento em congelação. Os dados representam médias e desvios padrões (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p<0,05$ ).

Figura 3.5 – Caracterização microbiológica, através da quantificação de bactérias mesófilas, nas formulações A (n=9) e B (n=4), ao longo dos meses de armazenamento em congelação. Os dados representam médias e desvios padrões (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Figura 3.6 – Amostras de produtos no T0 (RAL 6025), e amostra diluída (RAL 6002).

Figura 3.7 – Degradé de cores, desde a produção, em resultados das várias semanas de armazenamento em refrigeração, A) exemplo em solução diluídas; B) exemplo nas amostras contidas nos Falcon®, imagem à esquerda representa a cor do produto após produção (T0) e a imagem mais à direita representa a cor do produto totalmente alterada, após vários meses de conservação em refrigeração.

Figura 3.8 – Comparação de soluções diluídas, da formulação A em diferentes pontos de amostragem (T1 + 1 semana e T3 + 4 semanas), ambos com atribuição da classificação 2 - Ligeira alteração das características iniciais do produto, RAL 6010, segundo a tabela 2.2).

Figura 3.9 – Comparação de soluções diluídas, da formulação B em diferentes pontos de amostragem (T0 + 1 semana; T1 + 1 semana e T1 + 2 semanas).

Figura 3.10 – Fotografia do produto em congelação e após descongelação, não se registando alterações no aspeto.

Figura 3.11 – Pormenor de separação de fases (camada mais líquida à superfície), assim como alteração de cor (verde acastanhado), numa das formulações mantido em refrigeração

Figura 3.12 – Avaliação da precipitação dos produtos na coluna de água, no momento da preparação da solução diluída (0h), durante o tempo de prateleira dos 2 produtos em análise. Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre tratamentos em cada mês, encontram-se representadas através de diferentes letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Figura 3.13 – Avaliação da precipitação dos produtos na coluna de água, após 24h em repouso sem agitação, durante o tempo de prateleira dos 2 produtos em análise. Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre tratamentos em cada mês, encontram-se representadas através de diferentes letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Figura 3.14 – Avaliação da precipitação dos produtos na coluna de água, após 24h em repouso sem agitação, durante o tempo de prateleira dos 2 produtos em análise. Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre os meses analisados para a mesma formulação, encontram-se representadas através de diferentes letras e os asteriscos as diferenças entre tratamentos no mesmo mês (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Figura 3.15 – A) Processo de decantação registado fotograficamente ao longo das 24h; B) Medição do pellet formado após 24h de repouso, à temperatura ambiente, através da utilização de um paquímetro digital.

## Índice de Tabelas

---

Tabela 2.1 – Composição dos produtos comerciais em estudo, tratando-se da mesma microalga (*Nannochloropsis* sp.), as diferenças encontram-se relacionadas com a percentagem de peso seco da formulação (18% ou 15% PS) e a composição da solução salina (200 ppt ou 35 ppt).

Tabela 2.2 - Tabela resumo dos parâmetros analisados, com indicação do laboratório e metodologia, para as análises realizadas inicialmente (T0), para a formulação A e B.

Tabela 2.3 - Avaliação das características do produto, comparativamente com o padrão, com registo das alterações sensoriais ao nível da cor, cheiro e aspeto do produto.

Tabela 3.1 – Caracterização bioquímica, pela quantificação do conteúdo cinzas inicial, expresso em percentagem de peso seco, para as duas formulações.

Tabela 3.2 – Caracterização microbiológicas das formulações em estudo, no ponto de amostragem inicial (T0), para microrganismos patogénicos (e.g., *Vibrio* e *Salmonella*) e outros considerados indicadores de boas práticas de produção e higiene (e.g., enterobactérias, fungos e leveduras).

Tabela 3.3 – Caracterização e quantificação dos metais pesados, com base nos limites máximo em mg/kg (ppm) de alimento para um teor de humidade de 12 %, definido na Diretiva 2002/32/CE.

## Abreviaturas | Glossário

---

*aW* – atividade da água

D – Dias

e.g. – Por exemplo

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

g – Gramas

h - Horas

HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point* (Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos)

ISO - *International Organization for Standardization*

L – Litro

M – Mês/ Meses

mL – Mililitro

*nm* – Nanómetros

ODS – Objetivos de desenvolvimento sustentável

PA - Produto Acabado

ppm – Partes por milhão

ppt – Partes por mil

PS – Peso Seco

RAS – *Recirculating aquaculture systems*

S – Semana(s)

T - Temperatura (° Celsius)

T – Tempo

UFC - Unidade formadora de colónias

$\lambda$  - Comprimento de onda

Paquímetro - Instrumento utilizado para medir as dimensões lineares internas, externas e de profundidade.

RAL - Sistema de definição de cores desenvolvido originalmente em 1927, na Alemanha, a partir de uma tabela de 40 tonalidades.

Técnica de água verde – Metodologia utilizada em aquacultura, durante o cultivo larvar de algumas espécies marinhas, que consiste na introdução de microalgas nos tanques de cultivo durante os primeiros dias, promovendo uma maior ingestão de alimento e maiores taxas de sobrevivência larvar.

Tempo de prateleira ou *shelf-life* – Período de tempo durante o qual um produto permanecerá seguro e de qualidade adequada para consumo, quando armazenado de acordo com as instruções e em qualquer embalagem fechada em que foi fornecido.

Teste acelerado – Envolve o aumento intencional da deterioração do produto, através do aumento da temperatura de armazenamento, por forma a obter resultados mais rápidos, nomeadamente dados relativos ao tempo de prateleira de um produto.

Validade primária – Período desde a data de produção até ao limite de validade definido para um produto.

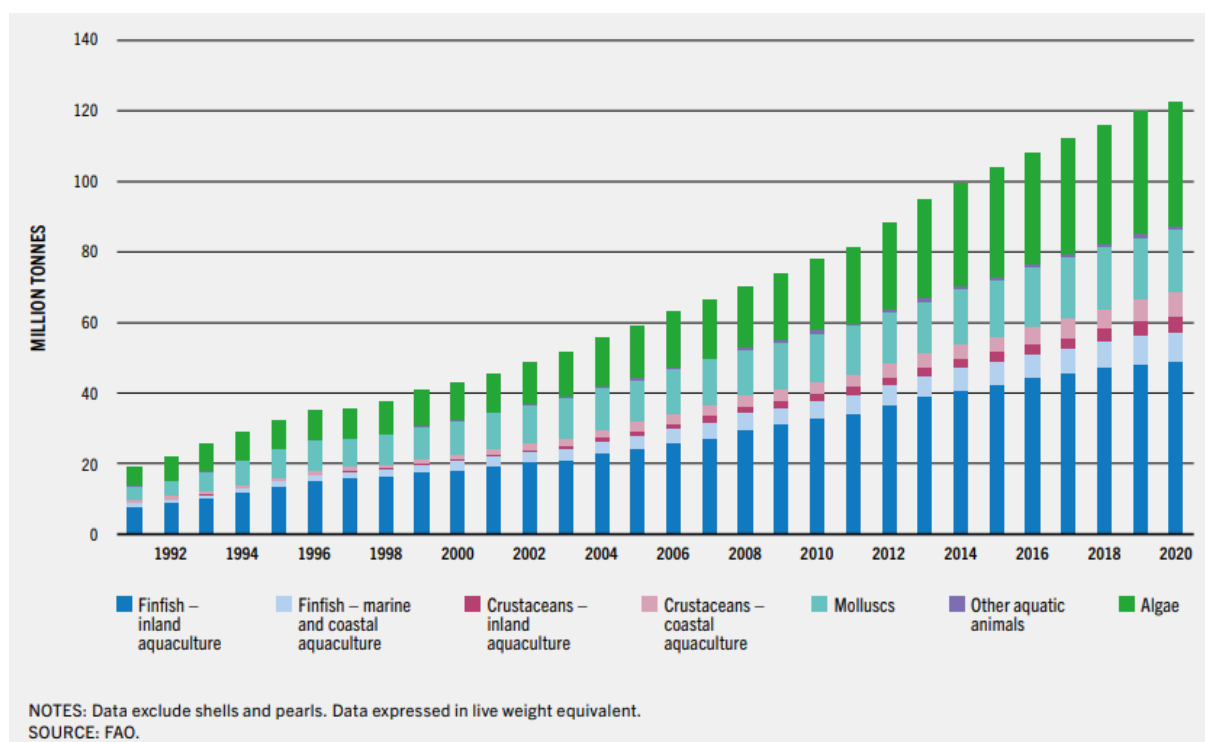
Validade secundária – Período indicado para o consumo/utilização do produto, após a abertura da embalagem, durante o qual deverá estar garantida a qualidade do produto.

## 1. Introdução

A aquacultura tem um papel importante no mercado global dos bens alimentares, em particular como resposta ao aumento da procura/consumo de pescado ao nível mundial e consequente escassez dos recursos naturais.

Como resultado da diminuição do pescado capturado em meio natural, torna-se necessário explorar novas vias na aquacultura, que incluam estratégias para uma melhor gestão da produção, através do desenvolvimento económico e ambiental sustentável, em conformidade com os principais objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS) definidos pela Nações Unidas.

A edição de 2022 do relatório "The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)", publicada pela FAO, refere que o crescimento da aquacultura, em particular na Ásia, elevou a produção total de pescas e aquicultura para um máximo histórico de 214 milhões de toneladas em 2020, incluindo 178 milhões de toneladas de animais aquáticos e 36 milhões de toneladas de algas, tal como representado na seguinte Figura.



**Figura 1.1** - Evolução do setor da aquacultura, ao longo das últimas décadas, in "The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)", publicada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO; 2022).

Uma das estratégias definidas para a atingir as metas estabelecidas, baseia-se na utilização de alimentos aquáticos adequados, que promovam o bem-estar e a saúde dos peixes e que sejam ricos em antioxidantes e antimicrobianos para garantir uma diminuição da mortalidade e um aumento da produtividade (Mishra et al., 2023).

Regimes alimentares adequados e específicos para espécies-alvo, são a solução sustentável que poderá melhorar significativamente o crescimento, a qualidade e a produtividade das espécies aquáticas. Neste contexto, as microalgas desempenham um papel importante na alimentação na fase inicial do desenvolvimento larva de algumas espécies marinhas. Outra aplicação das microalgas, baseia-se na sua atividade imunoestimulante, uma vez que melhoram o sistema imunitário e a taxa de sobrevivência das larvas (Mishra et al., 2023).

## 1.1 Cultivo de microalgas

---

A produção de microalgas em grande escala remonta à década de 1960 (Medipally et al., 2015) e tem vindo a evoluir desde então (Figura 1.1). Tratam-se de microrganismos eucarióticos unicelulares que podem crescer como células individuais ou associadas em cadeias ou colónias. Podem crescer e proliferar numa grande variedade de *habitats*, incluindo ambientes de água doce ou marinhos, e sob uma gama diversificada de condições abióticas, mesmo as mais extremas, como por exemplo em meios de elevada salinidade (Falaise et al., 2016; Khan et al., 2018).

O número total de espécies de microalgas existentes ainda está por determinar, tendo sido identificadas mais de 40 000 espécies (Richmond, 2004), porém poucas delas têm sido exploradas pela biotecnologia até agora. Sendo as mais importantes pertencentes às classes das Chlorophyceae (algas verdes - um grupo diversificado de microalgas que geralmente contém clorofila a e b, o que lhes confere a cor verde), Rhodophyceae (algas vermelhas - geralmente contém pigmentos como as ficobiliproteínas, o que lhes dá a cor avermelhada ou rosa), Bacillariophyceae (diatomáceas - caracterizadas por suas paredes celulares de sílica), Phaeophyceae (algas castanhas - conhecidas por sua pigmentação castanha, resultante de pigmentos como fucoxantina) e Eustigmatophyceae (onde se encontra incluída a microalga *Nannochloropsis* sp., muito utilizada em aquacultura devido ao seu perfil nutricional). A maioria das espécies de microalgas são autotrófica, mas algumas espécies são heterotróficas ou podem ser cultivadas em sistemas de mixotrofia.

O cultivo de microalgas é uma prática que continua em grande desenvolvimento, tendo várias aplicações, tais como a indústria alimentar, farmacêutica e até para a produção de

biocombustíveis. Todavia na sua grande maioria, as microalgas são utilizadas em sistemas de produção de aquacultura, em particular como alimento/enriquecimento para os cultivos auxiliares utilizados nos primeiros dias do cultivo larvar de algumas espécies marinhas (e.g., rotíferos, artémia) (Michalak,2015).

As microalgas possuem todas as qualidades necessárias para serem consideradas como alimento aquático sustentável ideal, uma vez que são ricas em proteínas e hidratos de carbono, facilmente digeríveis e o conteúdo lipídico rico em ácidos gordos ómega 3, sendo ainda fonte de aminoácidos essenciais, pigmentos, carotenoides e vitaminas (Mishra et al., 2023).

Verifica-se que cada vez mais existe a necessidade de efetuar a substituição de alguns ingredientes das rações usadas em aquacultura, nomeadamente através da incorporação de microalgas em substituição das farinhas de peixe, face à necessidade de gestão sustentável da atividade (Nagappan et al., 2021). As microalgas apresentam um valor nutricional com elevada sustentabilidade de produção e por este motivo são propostas como um bom substituto de ingredientes de baixa sustentabilidade, tal como o óleo e farinha de peixe que são subprodutos da pesca. Porém, a sua produção em modo industrial, ainda apresenta um preço final muito elevado e limitante para a utilização como ingredientes de rações em grande escala. No entanto, as microalgas são valiosos ingredientes funcionais de rações, já que diferentes espécies apresentam bioatividades úteis para o cultivo de peixe tal como atividades antioxidantes e imunoestimulantes.

Mesmo em quantidades reduzidas, os benefícios de utilização de algas nas dietas dos peixes, proporciona uma melhor taxa de crescimento, maior eficiência na utilização da ração, melhorias na microbiota intestinal, reforço do sistema imunitário e maior controlo na resposta ao *stress*, promovendo uma maior atividade fisiológica (Nagappan et al., 2021).

As microalgas são importantes para a vida aquática, como fonte de alimento do zooplâncton, vitais na cadeia alimentar de algumas das principais espécies produzidas em aquacultura, nomeadamente em todas as fases de crescimento de bivalves, crustáceos e nos primeiros estádios de desenvolvimento da maioria das espécies de peixes marinhos (Kaparapu, 2018).

Existe, cada vez mais disponível e em grande quantidade, biomassa produzida industrialmente das espécies de microalgas nutricionalmente relevantes para bivalves, larvas de peixes marinhos e alimento vivo (rotíferos e artémia) em diferentes tipologias como pasta, liofilizado (Piasecka et al., 2014), *spray-dried* (atomizados) (Zhang et al., 2022) e

concentrados líquidos, diminuindo deste modo a necessidade de produção interna por parte das aquaculturas.

A utilização de microalgas produzidas industrialmente para o cultivo de rotíferos é uma estratégia para aumentar o seu crescimento e equilíbrio nutricional, facilitando as operações de monitorização devido à sua elevada disponibilidade (Kotani et al., 2017), permitindo ainda uma maior flexibilidade operacional, pois não existe uma dependência direta do cultivo de microalgas em simultâneo com o cultivo de rotíferos.

Medipally et al. (2015) descreveram dois tipos de processos que ocorrem na produção de microalgas: i) os processos a montante, que envolvem a produção de microalgas propriamente dita, e ii) os processos a jusante que incluem a colheita, a secagem e/ou processamento (se necessário), obtendo-se na maioria dos casos formulações comerciais de elevado interesse.

No que diz respeito à produção de microalgas, existem algumas tecnologias que podem ser usadas isoladamente ou de forma combinada. Em sistemas fechados, com maior controlo dos fatores abióticos, tais como os fotobiorreactores (painéis planos ou *green wall*, sistemas de coluna de bolhas ou *airlifts*, fotobiorreactores tubulares) utilizados na produção autotrófica (luz do sol como principal fonte de energia).

Outra tecnologia em sistema fechados, é o cultivo em fermentadores (Doucha & Lívanský, 2012) e que apresenta uma alternativa para a produção de microalgas em condições heterotróficas, utilizando compostos orgânicos (e.g., glicose, acetato) como principal fonte de energia e carbono para o desenvolvimento da cultura, permitindo o crescimento da cultura em condições assépticas, com a utilização de *fed-batch* para manter o crescimento da cultura e permitir uma elevada densidade. Existindo ainda a possibilidade de utilização de sistemas mixotróficos que apresentam duas fases, uma autotrófica e outra heterotrófica (Bastos, 2017).

Em termos de produção em sistemas abertos, pode ser realizado utilizando lagoas abertas (utilizados desde a década de 1950) ou em sistemas do tipo instalações de *Raceway Ponds*, com algum grau de mecanização e controlo do cultivo autotrófico, porém bastante sujeitos às condições climáticas (Richmond, 2004).

De acordo com Borowitzka (1999) a escolha do sistema de produção deverá ser baseada em diversos fatores os quais incluem: as características biológicas da espécie de microalga, os custos associados à ocupação do solo, de operação e de energia, a disponibilidade e custo da utilização da água e dos nutrientes, bem como o tipo de produto final.

Os sistemas de cultivo em larga escala devem ser comparados pelas suas propriedades básicas tais como, a sua eficiência na utilização da luz, capacidade de controlo da temperatura, stress hidrodinâmico exercido sobre as microalgas e capacidade de manter a cultura estéril, ou seja, sem a presença de outras espécies de microalgas ou contaminantes (Borowitzka, 1999).

O desenvolvimento de dietas adequadas à alimentação de larvas marinhas, tem particular impacto quer ao nível de operação quer ao nível económico. Atualmente, o maior consumo de microalgas para o setor da aquacultura de peixes marinhos encontra-se baseado na utilização de produtos vocacionados para a nutrição de rotíferos e para a “técnica de água verde” (Kaparapu, 2018).

Face aos inúmeros avanços tecnológicos associados ao setor da aquacultura nas últimas décadas (e.g., sistemas RAS), também os protocolos de produção necessitam de ser adaptados, abrindo lugar para a inovação e desenvolvimento de novos produtos adaptados a estes sistemas, tornando-os mais específicos e funcionais.

## **1.2 Cultivo de rotíferos**

---

Os rotíferos são utilizados como presas vivas de modo a facultar alimento a diferentes espécies de peixes, desde a fase larvar à adulta (Forberg et al., 2017). Os rotíferos apresentam características biológicas vantajosas para inserção no regime alimentar dos peixes, uma vez que são filtradores não seletivos capazes de incorporar os nutrientes relevantes para a nutrição dos peixes, apresentam reduzidas dimensões (30 a 70nm) adequadas para alimentação de larvas e têm elevada digestibilidade por parte dos peixes e apresentam elevadas taxas de crescimento (Conceição et al., 2010; Forberg et al., 2017).

Os rotíferos estão agrupados em diversas espécies, sendo a espécie eurihalina *Brachionus plicatilis* a mais utilizada como alimento em aquacultura na Europa (Dhert et al., 2001). Considera-se que os rotíferos apresentam baixos requisitos nutricionais. Contudo, existem nutrientes essenciais, os quais precisam de ser fornecidos através da sua dieta, de modo a promover um adequado crescimento e desempenho biológico (Ferreira et al., 2011).

A utilização da microalga *Nannochloropsis* sp. no cultivo de rotíferos, continua a apresentar bons resultados na percentagem de crescimento de *Brachionus* sp. (Dhont et al., 2013), podendo esta ser fornecida como alga viva ou através da utilização de formulações comerciais *ready-to-use*, como é o caso dos concentrados líquidos. No entanto, para obter uma boa taxa

de crescimento, é essencial suprir as suas necessidades nutricionais dos rotíferos, pelo que todos os produtos requerem otimização de acordo com o modo de produção e sistema de cultivo, permitindo o aumento da eficiência da aplicação do produto e do crescimento populacional.

O regime de produção de rotíferos mais comum em aquacultura é realizado em sistemas de *batch* (Dhert et al., 2001). Este tipo de produção é realizado em sistemas de cultivo fechado durante um curto período de tempo (3 a 4 dias), com recolha total da população decorrido esse período. No entanto, modo de cultivo requer muita manutenção e apresenta custos operativos mais elevados do que os semi-contínuos (Rojo-Cebreros et al., 2017).

Os sistemas de cultivo fechados não incluem renovação de água, exceto a substituição mínima essencial para a manutenção da qualidade da água ou reposição da água evaporada (e.g., 5 % de renovação diária de água) (Tidwell, 2012). Como exemplo de sistemas de cultivo fechado considerados de elevada sustentabilidade, podemos referir o *Recirculation Aquaculture Systems* (RAS), o qual permite o cultivo de espécies que necessitam de elevada qualidade de água em sistema fechado, permitindo um maior controlo sobre os parâmetros ambientais e de qualidade da água, possibilitando assim condições ótimas de produção (Badiola et al., 2012).

Porém, os sistemas RAS não são sistemas simples, exigindo uma monitorização apertada da interação tecnologia-biologia, que exigem uma monitorização do desempenho, sendo considerados sistemas de "alta tecnologia" (Badiola et al., 2012). Vários estudos realizados enumeram alguns dos aspetos que contribuem para a dificuldade de gestão de um sistema RAS, nomeadamente a utilização de filtros biológicos subdimensionados, dificuldade na remoção de partículas e a formação elevada de espuma, assim como dificuldades no controlo dos parâmetros bioquímicos (e.g., pH, amónia) (Badiola et al., 2012).

O regime de produção de rotíferos semi-contínuo baseia-se em cultivos realizados ao longo do tempo, onde há uma colheita diária de parte da população, permitindo o crescimento da população de forma contínua (Kostopoulou et al., 2012). Tal como referido anteriormente, a deterioração da qualidade da água é um dos grandes desafios deste modo de produção, quando é realizado em sistemas de cultivo fechados, ou periodicamente quando em cultivos longos como o semi-contínuo, pois esta, aumenta a probabilidade de redução do crescimento da população ou mesmo *crash* (Ferreira et al., 2011).

A redução da produtividade pode dever-se ao aumento da concentração de metabolitos tóxicos para os rotíferos tal como amónia (Schlüter & Groeneweg, 1985). Por outro lado, o

aumento da concentração de bactérias no cultivo aumenta a probabilidade de ocorrência de estirpes patogénicas que podem promover mortalidade da população de rotíferos, assim como das larvas de peixe alimentadas com os rotíferos contaminados (Kagali et al., 2019).

O regime semi-contínuo de produção de rotíferos pode ser também realizado em sistemas RAS. Neste tipo de sistema de aquacultura é possível atingir concentrações de rotíferos muito superiores aos cultivos realizados em sistemas fechados devido à elevada manutenção da qualidade da água do sistema (Badiola et al., 2012), salvaguardando uma correta monitorização das condições de cultivo, tal como referido anteriormente.

### **1.3 Breve descrição da empresa Necton, SA**

---

A Necton, Companhia Portuguesa de Culturas Marinhas, SA está situada num local único, o Parque Natural da Ria Formosa, em Olhão (Algarve). Este enquadramento revela-se no "código genético" da empresa, uma profunda e enraizada filosofia de preservação do ambiente natural, da biodiversidade e da defesa do património natural (Figura 1.2).



**Figura 1.2** - Parque Natural da Ria Formosa Natural - Algarve, onde se encontram localizadas as instalações da empresa Necton, S.A.

A empresa fundada em 1997, surge com o intuito de dar corpo a um projeto que nasceu na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, que teve como finalidade a produção de microalgas, na área da biotecnologia marinha. Trata-se da empresa mais antiga da Europa a produzir e vender microalgas.

Atualmente, a atividade da empresa baseia-se em 2 unidades de negócio, uma associada à produção e comercialização de sal marinho tradicional e flor de sal (Figura 1.3) e a outra relacionada com a produção e comercialização de microalgas (Figura 1.4).



**Figura 1.3** - Unidade de Negócio do Sal, empresa Necton, S.A, com detalhe das zonas produtivas de sal marinho tradicional e flor de sal.

Ao longo dos mais de 25 anos, a equipa da Necton adquiriu experiência na produção de mais de 30 espécies de microalgas, principalmente de água salgada, mas também de água doce. Com produtos disponibilizados para aquacultura, como alimentos em diferentes fases de produção de peixes, bivalves e crustáceos e outros fins, ou para outros setores, tais como o sector da cosmética (*in* <https://phytobloom.com>).



**Figura 1.4** – Unidade de Negócio das Algas, empresa Necton, S.A, com detalhe de algumas das tecnologias de produção disponíveis (e.g., cultivo de inóculos de microalgas em meio sólido ou em meio líquido, sistemas de coluna de bolhas ou *airlifts* e sistema de cultivo em grande escala, tais como painéis planos ou *green wall*, *raceway*, fotobiorreactores).

A sua história, experiência e colaboração constante com universidades, centros de investigação e outras empresas, elevaram a Necton ao estatuto de uma das empresas europeias líderes em Biotecnologia de Microalgas, a mais antiga da Europa a produzir microalgas. O processo produtivo, propriamente dito, inicia-se com a aquisição de pequenos volumes de inóculos obtidos em *culture collection*, podendo em algumas situações ser isoladas do meio natural ou obtida através de centros de investigação.

O cultivo inicia-se em placas de Petri e/ou pequenos volumes de inóculos, os quais são monitorizados e repicados regularmente por forma a aumentar o volume de inóculo disponível para a produção no exterior. Nesta fase, existe um maior controlo das condições de cultivo (intensidade luminosa – luz artificial; temperatura – controlada; pH – injeção de CO<sub>2</sub>, diretamente no sistema de arejamento).

Paralelamente, existe uma das etapas fundamentais para o sucesso da produção, a qual engloba o tratamento de água utilizada em todas as etapas do cultivo de microalgas. A água salgada, para a produção de microalgas, é captada da Ria Formosa através de um sistema de bombagem sendo posteriormente tratada mediante uma combinação de vários processos: pré-filtração, ultrafiltração, tratamento químico e por radiação ultravioleta. Durante este processo ocorre ainda uma etapa de ajuste de salinidade de acordo com as necessidades das microalgas em produção. Periodicamente são efetuadas as análises para controlo de qualidade da água do processo (análises microbiológicas e químicas).

Em função do planeamento, e após verificação dos parâmetros de qualidade estipulados internamente, são definidos os volumes a transferir, os quais dependerão também do sistema produtivo a inocular (*green walls* e fotobiorreactores tubulares) e das características da espécie de microalga.

O cultivo de microalgas no exterior, inicia-se com um processo de adaptação relacionado com fatores abióticos. O primeiro, e talvez o mais proeminente, é a mudança nas condições de luz. No exterior, toda a luz que as culturas recebem provém do sol, pelo que, não só, dependendo da estação do ano, as horas de luz disponíveis variam, como também o clima é um dos principais fatores que influenciam o crescimento da cultura. Além disso, as variações de temperatura são inevitáveis, e as grandes diferenças entre a noite e o dia podem, também elas ter impacto na produtividade, e até em casos extremos causar o colapso da cultura.

Diariamente, as culturas são acompanhadas e analisados os parâmetros de cultivo e qualidade, sendo necessário corrigir as condições de cultivo, através da regulação do pH, adição de soluções nutritivas e em algumas situações com recurso a ensombramento e/ou

diminuição da temperatura por ação de sistema de refrigeração (dispersores de águas exteriores).

Uma vez atingida a concentração celular mínima recomendada, a cultura pode ser transferida para outros reatores de produção ou recolhida uma percentagem de volume da cultura e adicionado novo meio ao reator. Em algumas situações pode ser efetuada a recolha total do reator.

O volume renovado é filtrado e transferido para os depósitos de colheita refrigerados, de modo a manter a qualidade da cultura, nomeadamente a nível microbiológico. Com base no planeamento, a cultura poderá ser encaminhada para um processo de concentração, por sistema de membranas ou ser diretamente centrifugado, ocorrendo uma separação da biomassa algal e do meio líquido.

A recolha da biomassa resultante do processo de centrifugação é efetuada sempre que necessário até à conclusão da centrifugação do volume recolhido (centrifuga descontínua), sendo efetuado, a cada *batch*, a análise os parâmetros de qualidade de acordo com as especificações de cada microalga e/ou definidos no plano de controlo definido pela empresa.

Após o processo de separação (fase líquida/fase sólida), a biomassa resultante será posteriormente acondicionada nas embalagens de produto acabado e armazenada em congelação (< -18°C). Nesta fase, são analisados alguns dos parâmetros de avaliação do produto, nomeadamente análises sensoriais, tais como a cor, cheiro, aparência e determinação da percentagem de peso seco, neste caso através do método de desidratação. São ainda retiradas amostras para análises externa de parâmetros microbiológicos e químicos (por exemplo a determinação do conteúdo em proteínas, lípidos e cinzas).

A empresa apresenta no portefólio diferentes tipologias de produtos, nomeadamente produtos na forma de pastas concentradas congeladas, produtos secos por liofilização e formulações concentradas líquidas *ready-to-use*, todas elas adaptadas às reais necessidades dos clientes/mercados a que se destinam (in, <https://phytobloom.com>).

A estratégia da Necton baseia-se no desenvolvimento de produtos e serviços em todas as suas áreas de negócio, de forma a satisfazer e fidelizar os seus clientes, sendo de extrema importância o processo associado à determinação do tempo de prateleira dos seus produtos.

Realçar ainda que um dos pilares da empresa, prende-se com a qualidade e segurança dos produtos comercializados, em todas as etapas da cadeia de fornecimento, destacando o facto que a Unidade de Negócio das Algas obteve, no início de 2023, a certificação segundo a

norma ISO 22000:2018 – Sistema de Gestão da Segurança Alimentar, a qual se baseia nos princípios do HACCP do *Codex Alimentarius*, internacionalmente reconhecidos.

#### **1.4 Desenvolvimento de novos produtos**

---

Existe uma pressão crescente para que o processo de desenvolvimento e lançamento de novos produtos seja realizado num menor espaço de tempo possível, o que em alguns casos poderá trazer constrangimentos, por exemplo em relação à definição do prazo de validade (tempo de prateleira) dos produtos (Campden, 2014).

O processo de desenvolvimento de produtos implementado na empresa Necton, S.A., baseia-se em várias fases-chave, incluindo a identificação dos requisitos do cliente e a sua aplicabilidade, o desenvolvimento da formulação do produto, a tipologia de embalamento e de conservação, entre outros. Sendo por isso necessária a criação de um projeto detalhado, a realização de produção em fase piloto, testes em parceria com clientes/centros de investigação, antes da comercialização dos produtos.

Internamente, é imprescindível a participação de uma equipa multidisciplinar para o sucesso do projeto, nomeadamente representantes da área comercial, de produção/processamento, da qualidade e da área da inovação/investigação.

Inicialmente é efetuado um levantamento dos fatores intrínsecos e extrínsecos com impacto no desenvolvimento de uma nova formulação e/ou produto. Intrinsecamente, o tipo de ingredientes, o processamento e a embalagem. Extrinsecamente, fatores tais como a qualidade das matérias-primas, a temperatura de armazenamento e a exposição à luz podem ter impacto no produto e são frequentemente exacerbados por uma cadeia de fornecimento complexa e imperfeita, em particular nos produtos com requisitos de armazenamento e transporte a temperatura controlada.

Durante o desenvolvimento do produto, poderá ainda existir um processo de ensaios experimentais para otimização de aspetos relacionados com a formulação do produto, melhorias nos processos e/ou equipamentos, por forma a obter uma formulação o mais funcional possível.

Na conceção da formulação do produto, deverá ser tido em conta a compatibilidade das várias matérias-primas, aquando a produção, no caso de produtos compostos. Mesmo com uma seleção cuidadosa dos ingredientes e um processamento adequado, poderá existir alguma

variabilidade da qualidade do produto, afetada pela tipologia de embalagem e preservação do produto.

A seleção de uma embalagem com propriedades de barreira inadequadas ou com uma selagem deficiente, poderá por exemplo encurtar o prazo de validade, pelo que deve ser mais um dos pontos a ter em consideração no desenvolvimento do produto a comercializar.

Outro dos fatores já enumerado anteriormente, e que poderá ter um impacto significativo na qualidade e durabilidade de um produto, está relacionado com o modo de armazenamento, nomeadamente se o mesmo tiver necessidade de temperaturas controladas, como por exemplo para produtos congelados.

Todos os produtos congelados necessitam, para manterem a sua estabilidade e o tempo de vida adequado, que a temperatura de armazenamento seja superior à temperatura de congelamento ( $< -18^{\circ}\text{C}$ ). Qualquer desvio na cadeia de frio, poderá significar alterações na qualidade do produto, algumas delas visualmente impercetíveis, e que afetarão apenas ao nível nutricional, outras bastante visíveis, tais como a alteração de cor e aspeto, como por exemplo a formação de cristais de gelo.

Com base na informação disponível, a determinação do prazo de validade de um produto requer um estudo que avalie as suas características, ao longo do tempo em condições típicas de embalagem e modo de conservação/armazenamento.

Na maioria dos casos, são recolhidas múltiplas amostras de um único produto em condições estáveis de temperatura, humidade e luz e, em seguida, comparadas com uma amostra de referência (Giménez et al., 2012). O momento em que uma característica crítica do produto deixa de satisfazer as expectativas de qualidade do cliente, deve ser definido como o ponto final do prazo de validade sob estas condições de ensaio, muitas vezes refletidas numa data indicada na rotulagem (Giménez et al., 2012).

Apesar de alguns dos ensaios descritos poderem demorar um ano ou mais, não significa que a empresa necessite de esperar até à conclusão de um teste para lançar um produto, podendo ser utilizadas outras fontes de modo a obter uma estimativa inicial do prazo de validade.

Primeiramente, poderá ser efetuada uma avaliação do histórico de produtos existentes, quer na empresa, quer no mercado com características semelhantes - os da mesma categoria de produtos e que utilizam processamento e ingredientes semelhantes – por forma a fornecer dados para uma avaliação rápida mais rápida. Esta abordagem pode ser um desafio, pois é difícil saber o prazo de validade exato de um produto comercializado por uma empresa

concorrente, a menos que a data de fabrico seja decifrável a partir do código impresso na embalagem do produto.

Em segundo lugar, consultar a legislação e informação bibliográfica associada à categoria do produto, por forma a avaliar se existem estudos realizados que evidenciem um determinado prazo de validade.

Em terceiro lugar, a empresa pode internamente, recolher informações sobre as características do produto, à medida que este é desenvolvido, com base num plano de amostragem previamente definido, o qual deverá incluir os tempos de amostragem, bem como os parâmetros e metodologias a utilizar na caracterização do produto, efetuado uma estimativa ponderada.

### **1.5 Tempo de prateleira - metodologia**

A definição de prazo de validade de um produto, baseia-se no período durante o qual é expectável que o produto mantenha as características inicialmente definidas, desde que garantidas as condições de conservação e de utilização indicadas, para o mesmo (Giménez et al., 2012).

Os procedimentos mais utilizados para determinar o tempo de prateleira (*shelf-life*) de um produto são fundamentados na deteção de alterações microbiológicas, alterações sensoriais e alterações físico-químicas (FSAI, 2022).

Há dois grupos de características que afetam o prazo de validade de um produto. O primeiro grupo é composto por alterações químicas e físicas, enquanto o segundo inclui alterações microbiológicas e deterioração. Estas alterações de qualidade, que são visíveis para o cliente, afetam o prazo de validade de um produto, com impacto significativo para a empresa, caso seja necessária dar resposta a uma reclamação e/ou à destruição do produto não conforme/deteriorado (FSAI, 2022).

Fatores de alteração físico-químicas:

- a) Humidade - A humidade pode migrar para dentro e para fora de um produto, podendo causar alterações na sua textura (e.g., textura mais macia – sinal de absorção de humidade; textura mais desidratada – perda de humidade);
- b) Temperatura - O abuso de temperatura, ou o desvio prolongado do estado de temperatura desejado, pode causar problemas de qualidade;

- c) Luz - A exposição à luz irá, com o tempo, causar alterações no aspeto de um produto, como o branqueamento ou o escurecimento do produto. A exposição à luz também pode acelerar as reações de rancidez oxidativa;
- d) Oxigénio - Tal como a humidade, o oxigénio migrará através da embalagem de um produto selado. À medida que o oxigénio migra para um produto, pode acelerar a rancidez oxidativa.

Fatores de alteração microbiológica - O crescimento de leveduras, bolores e bactérias pode contribuir para uma mudança nas características organolépticas do produto, reduzindo funcionalmente o seu prazo de validade, frequentemente identificadas por uma alteração visual da cor, do cheiro e/ou textura/aspeto. Podendo em alguns casos, ser visível pela alteração do formato da embalagem (por exemplo embalagem inchada), fornecendo deste modo um indicador visível de que existiu alguma alteração das características iniciais.

A etapa de formulação do produto, o método de processamento e a temperatura de armazenamento podem diminuir o risco de deterioração microbiológica. Por exemplo, o pH baixo do produto (inferior a 4,6) e a baixa atividade da água impedem o crescimento da maioria dos organismos de deterioração, enquanto o processamento, como o tratamento térmico ou a pasteurização, reduz a carga microbiológica global. A refrigeração e a congelação são também utilizadas como forma de controlar a carga microbiana de um produto (FSAI, 2022).

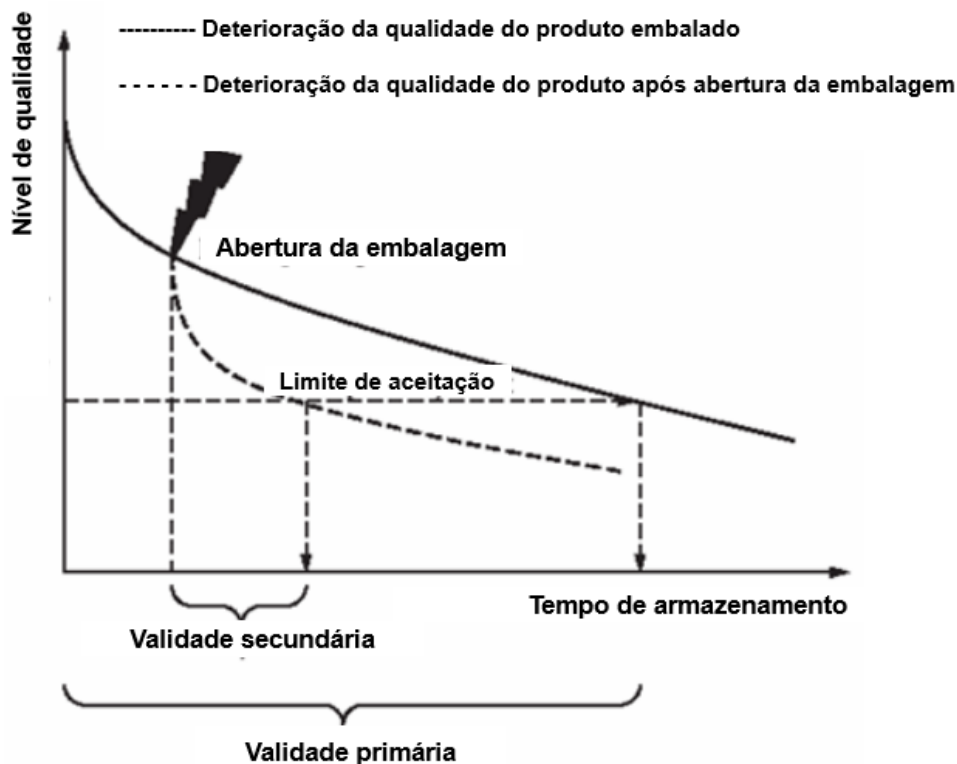
A cadeia de frio, para produtos destinados a permanecerem congelados ou refrigerados, durante a distribuição podem sofrer abusos de temperatura, criando uma oportunidade para a deterioração microbiológica, pelo que a proteção contra o crescimento de microrganismos patogénicos deve ser integrada na conceção do produto e nos processos de fabrico, devendo existir medidas de controlo preventivas para garantir uma produção segura.

## **1.6 Influência do tempo de armazenamento na validade dos produtos**

Após o embalamento, todos os produtos possuem uma validade primária e uma validade secundária. A validade primária engloba todo o período de tempo durante o armazenamento, onde o produto mantém o nível de aceitação por parte do consumidor. A validade secundária é definida como o período de tempo após a abertura da embalagem, durante o qual os produtos mantêm um nível aceitável de qualidade (Nicoli, 2012; Robertson, 2010).

A partir do momento em que ocorre a abertura da embalagem, existem várias reações que começam a acontecer e que alteram as características do produto, como alterações na

atividade da água ( $a_w$ ) e atividade microbiológica, por ação da interação com o ambiente (e.g., troca de gases) e que aceleram a queda na curva da qualidade, tal como esquematizado na Figura 1.5 (Nicoli, 2012).



**Figura 1.5** - Diminuição da qualidade dos produtos em função do tempo de armazenamento, em função da abertura da embalagem e os respectivos valores de tempo de prateleira primária e secundária. Adaptado de (Nicoli, 2012).

A qualidade do produto, após abertura e durante o respetivo armazenamento, irá depender diretamente das condições em que o mesmo será mantido, ou seja, tratando-se de um produto que necessita de temperatura controlada, (e.g., refrigeração), qualquer falha no sistema de refrigeração poderá comprometer o tempo de prateleira definido inicialmente.

## 1.7 Objetivos

O objetivo do presente relatório baseia-se na caracterização do tempo de prateleira durante o desenvolvimento de novos produtos em concentrados líquidos da microalga *Nannochloropsis* sp. para aquacultura.

Essa caracterização envolve a monitorização das alterações (sensoriais, bioquímicas, microbiológicas e físicas):

- a) durante o tempo de armazenamento em congelação – validade primária do produto;
- b) após a abertura da embalagem, durante o tempo de conservação à temperatura de refrigeração – validade secundária do produto.

## 2. Metodologia

---

De modo a monitorizar as alterações que ocorrem durante o tempo de armazenamento até atingir a validade estimada do produto, procedeu-se à análise das características bioquímicas, microbiológicas e organoléticas de duas formulações da gama concentrados líquidos, desenvolvidas para a nutrição de rotíferos.

Uma das formulações considera-se adaptada à produção de rotíferos em sistemas de *batches* (formulação A) e a outra foi desenvolvida para o cultivo em sistemas *RAS*, utilizado no modo de produção semi-contínuo (formulação B).

A espécie *Nannochloropsis* sp. é uma microalga nutricionalmente equilibrada e utilizada com sucesso no cultivo de rotíferos (Dhont et al., 2013), tendo sido a espécie que a empresa selecionou para a formulação dos concentrados líquidos.

A Necton, S.A., já disponha de um concentrado líquido com esta microalga, tendo sido efetuados alguns ensaios para formulação de produtos específicos para a utilização em sistemas de cultivo distintos, tal como referido anteriormente.

Os produtos desenvolvidos (tabela 2.1), foram obtidos através da modificação de duas variáveis:

- a) alteração da concentração salina da solução diluente (de 200 ppt para 35 ppt);
- b) alteração da composição em termos de peso seco (de 18% para 15% peso seco).

### 2.1 Preparação do produto

---

Após o *scale up* da microalga *Nannochloropsis* sp. de acordo com os protocolos de produção da empresa, resumidamente descritos no ponto 1.1, é possível obter, por centrifugação (centrífuga GEA Westfália®, Alemanha) a quantidade necessária de biomassa para a produção, à escala industrial, das formulações em estudo.

Cada formulação, é produzida com base em instruções de trabalho internas, devidamente suportada por boas práticas de produção e com etapas de avaliação a cada *batch*, de acordo com os planos de controlo definidos, baseados em critérios de qualidade.

Após a mistura, o produto é embalado e mantido em congelação até à sua comercialização, não existindo diferenças entre formulações, relativamente ao equipamento utilizado na produção, nem em relação ao material de embalagem utilizado para o acondicionamento.

**Tabela 2.1** – Composição dos produtos comerciais em estudo, microalga (*Nannochloropsis* sp.), as diferenças encontram-se relacionadas com a percentagem de peso seco da formulação (18% ou 15% PS) e a composição da solução salina (200 ppt ou 35 ppt).

<b>Produto</b>	<b>Formulação A</b>	<b>Formulação B</b>
Composição (ingredientes)	<i>Nannochloropsis</i> sp. + Solução hipersalina (200 ppt)	<i>Nannochloropsis</i> sp. + Solução salina (35 ppt)
% Peso seco	18%	15%

## 2.2 Recolha de amostras

Para a caracterização de cada *batch* de produção, foram retiradas amostras representativas (em tubos Falcon® de 50 mL), armazenadas em congelação até serem encaminhadas para um laboratório externo (serviço subcontratado), mantendo sempre uma das amostras em refrigeração para avaliação do tempo de prateleira (período mínimo de 4 semanas ou até que a mesma seja considerada não conforme) e outra em congelação como testemunho, caso seja necessária a repetição de algum parâmetro.

Tendo dado continuidade ao trabalho analítico iniciado anteriormente na empresa, associado a uma das teses de mestrado desenvolvidas na Necton, S.A., a Figura 2.1 representa os vários pontos de amostragem anteriormente definidos (Costa, 2022).

A título de enquadramento das amostragens realizadas anteriormente, após finalização da produção piloto da formulação A e B, foram preparadas 3 réplicas, para cada ponto de amostragem, as quais foram devidamente identificadas e armazenadas à temperatura de congelação (< -18°C), em tubos Falcon® de 50 mL, de acordo com as indicações das especificações do produto (Costa, 2022).

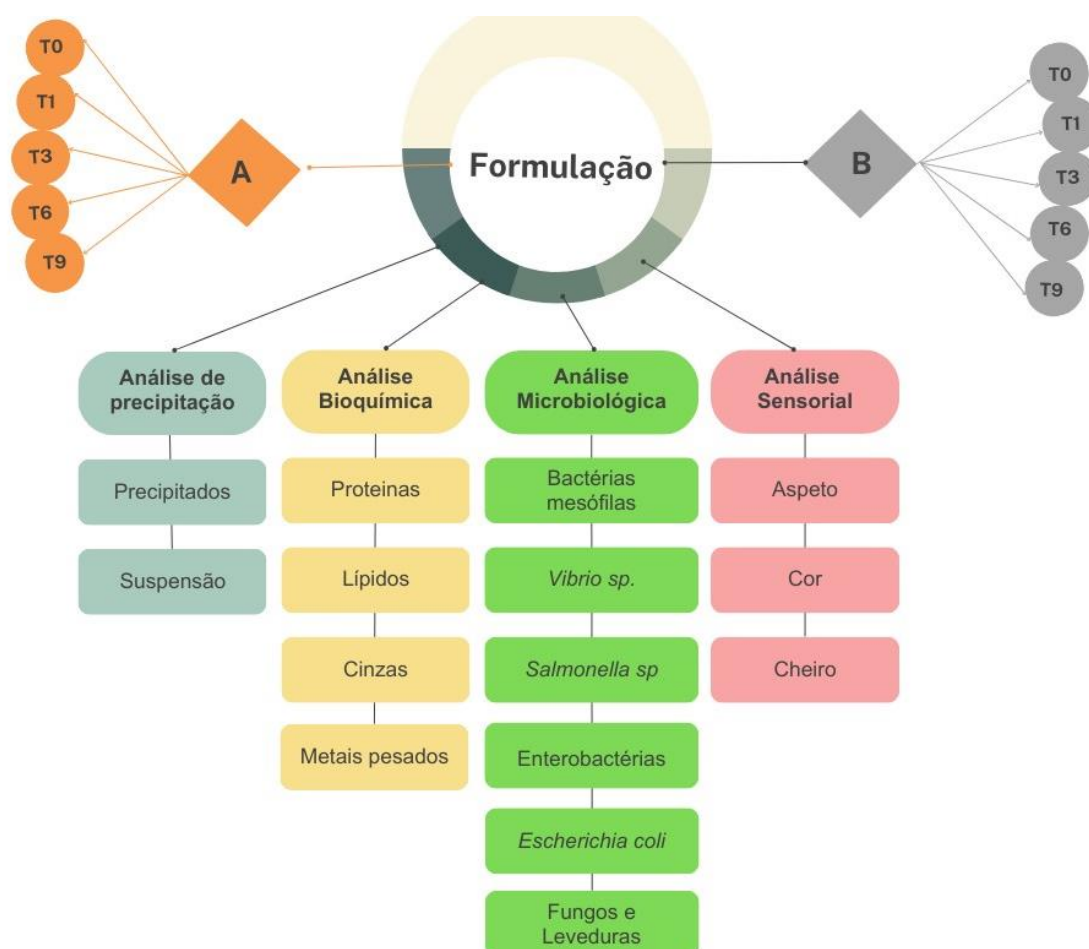
Em cada ponto de amostragem, as amostras foram retiradas da congelação, conservadas em refrigeração, por forma a realizar as diversas análises, tal como indicado na Figura 2.1.

## 2.3 Desenho experimental

O desenvolvimento de novos produtos, da empresa Necton, tem por base a aplicação de protocolos internos, nomeadamente ao nível da avaliação da qualidade, definição das especificações e do respetivo tempo de prateleira (*shelf-life*).

Todas estas análises são de extrema importância, pois terão impacto na caracterização da qualidade do produto e podem influenciar a performance dos resultados obtidos durante a sua utilização, diminuindo a eficácia dos mesmos, resultados estes que, em última análise poderão indicar a necessidade de reformulação do produto.

Face ao exposto, considerou-se de extrema importância dar continuidade ao estudo anteriormente desenvolvido (Costa, 2022), uma vez que mesmo não haviam sido finalizados alguns dos ensaios previstos para os últimos pontos de amostragem (T6 e T9).



**Figura 2.1** – Diagrama resumo das análises realizadas às formulações piloto, desenvolvidas no âmbito da conceção dos dois pontos, assim como os pontos de amostragem.

A tabela 2.2, resume o desenho experimental base, definido as análises realizadas para cada ponto de amostragem, de acordo com o representado também na Figura 2.1 para os primeiros lotes formulados, tendo sido dada continuidade às análises realizadas anteriormente na base de uma tese de mestrado (Costa, 2022).

**Tabela 2.2** - Tabela resumo dos parâmetros analisados, com indicação do laboratório e metodologia, para as análises realizadas inicialmente (T0), para a formulação A e B.

<b>Caracterização</b>	<b>Laboratório</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Método</b>
Análise sensorial	Interno	Aspeto Cor Cheiro	Análise sensorial (escala de caracterização)
Análise de precipitação		Precipitados	Medição do <i>pellet</i> (mm)
		Suspensão	Espectrofotometria ( $\lambda=540$ nm)
Análise bioquímica	Externo	Proteínas	Volumetria
		Lípidos	Gravimetria
		Mercúrio Cadmio Chumbo Arsénio	Absorção atómica
Análise microbiológica		Bactérias Mesófilas <i>Vibrio sp.</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Escherichia coli</i> Enterobactérias Fungos   Leveduras	Contagem em placa

### 2.3.1 Caracterização da composição bioquímica e microbiológica

As análises bioquímicas e microbiológicas descritas ao longo deste relatório, à semelhança do que acontece com os restantes produtos comercializados pela empresa, foram realizadas em laboratórios subcontratados acreditados.

A cada *batch* de produção está associada uma preparação de amostras para o laboratório, as quais são acondicionadas em caixas de transporte com termoacumuladores de gelo, para manter a temperatura durante o transporte. Todas as amostras seguiram devidamente identificadas e acompanhadas com a respetiva requisição para indicação dos parâmetros a analisar.

Posteriormente os resultados foram rececionados em boletins analíticos, os quais foram devidamente analisados, validados e arquivados, de acordo com os procedimentos internos da empresa.

**Caracterização bioquímica** – análises realizadas em laboratório externo devidamente acreditado pela norma EN ISO/IEC 17025, para determinação de conteúdo proteico, lipídico, cinzas em percentagem de peso seco e a determinação de metais pesados (mercúrio, cádmio, chumbo e arsénio);

De acordo com Regulamento da Comissão Europeia (UE) nº 68/2013, última redação de 24/07/2022, relativo à colocação no mercado e à utilização de alimentos para animais, e em particular para a categoria das algas, é necessária a caracterização dos produtos relativamente ao seu conteúdo em proteínas, lípidos e cinzas.

**Caracterização microbiológica** – análises realizadas em laboratório externo devidamente acreditado pela norma EN ISO/IEC 17025, para a determinação de microrganismos mesófilos, *Vibrio sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, enterobactérias, fungos e leveduras, os resultados obtidos foram expressos em número de unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g).

### 2.3.2 Análise sensorial do produto

A análise sensorial dos produtos, foi realizada segundo protocolos internos existentes, a qual possibilita a avaliação de alterações de cor, cheiro e aspeto do produto. Para tal, foi considerada uma escala de 1 a 4, de acordo com os detalhes da tabela 2.3.

As análises relacionadas com o aspeto, cor e cheiro, foram realizadas em diferentes momentos dependente do lote a analisar e ponto amostragem, a partir das amostras recolhidas em Falcon®:

- a) no momento da produção – todos os lotes produzidos (desde 2022 até à data);

- b) após descongelação, a cada ponto de amostragem, no seguimento das análises ao longo do tempo de prateleira – lotes associados à continuidade das análises do estudo iniciado anteriormente (Costa, 2022);
- c) durante o período de conservação em refrigeração, neste caso no mínimo uma vez por semana, até atingir o tempo de prateleira em refrigeração e/ou as amostras serem consideradas não conformes (classificação 4), de acordo com a descrição da tabela 2.3 – todos os lotes produzidos (desde 2022 até à data);

A comparação foi efetuada diretamente da amostra testemunho, no caso das amostras de cada lote produzido e/ou com base numa solução diluída (preparação da diluição do produto (5 mL/L) em água do mar (35 ppt)), este último no seguimento da metodologia aplicada na tese de mestrado que iniciou a avaliação das primeiras formulações (Costa, 2022).





Ao nível da avaliação da cor, a mesma foi efetuada por comparação do produto com uma escala de cores (e.g., RAL), a qual apresenta um código de cores. Neste caso, tratando-se de um microalga verde, o produto formulado mantém a cor original da microalga, sendo que a escala de cores varia na ordem do RAL 6000, tal como representado na Figura 2.2.



**Figura 2.2** - Escala de cores utilizada para a classificação dos produtos, RAL (in, <https://sthelenswindows.com/colours/ral-greens>).

As restantes avaliações sensoriais estão relacionadas com o aspeto do produto, nomeadamente a presença de separação de fases, formação de fungos/bolores à superfície, assim como alteração ao nível de cheiro/odor característico, comparativamente com o padrão.

**Tabela 2.3** - Avaliação das características do produto, comparativamente com o padrão, com registo das alterações sensoriais ao nível da cor, cheiro e aspeto do produto.

Classificação	Descrição das características a avaliar	Cor
1	<b>OK</b> <i>(RAL 6035 – amostra concentrada   RAL 6001 ou RAL 6002 – solução diluída; cheiro intenso; aspeto homogéneo)</i>	
2	<b>Ligeira alteração das características iniciais do produto</b> <i>(RAL 6010, 6017; cheiro pouco intenso; sem alterações perceptíveis)</i>	
3	<b>Alteração significativa das características iniciais do produto</b> <i>(RAL 6025; cheiro quase neutro; ligeira separação de fases, mas não perceptível após agitação)</i>	
4	<b>Não conforme</b> <i>(RAL 6008, 6014, 6022; cheiro acidificado; separação de fases perceptível após agitação)</i>	

### 2.3.3 Análise de precipitação do produto

Análise de precipitação do produto realizado segundo protocolo interno, de forma a avaliar a suspensão e precipitação do produto na coluna de água, ao longo do tempo, sendo necessário a preparação de uma solução diluída do produto (5 mL/L) em água do mar (35 ppt), em tubo de Falcon® de 15 mL.

Os tubos Falcon®, contendo 12 mL da solução diluída (n = 3, réplicas técnicas) são mantidos sem agitação à temperatura ambiente, com a medição do pellet formado após 24 h, realizada com um paquímetro digital (MITUTOYO Absolute 150 mm), de modo a avaliar a precipitação do produto.

Para a avaliação da capacidade de suspensão dos produtos na coluna de água, é realizada a análise da densidade ótica (medição da absorvância,  $\lambda = 540$  nm), por espectrofotometria (Shimadzu UV-mini 1240 Kyoto, Japão), imediatamente depois da preparação da diluição (0h) e após 24h. Tendo sido inicialmente necessário a realização de uma reta de calibração, relacionando a densidade ótica com o peso seco do produto (15 ou 18% PS).

## **2.4 Análise de dados e estatística**

---

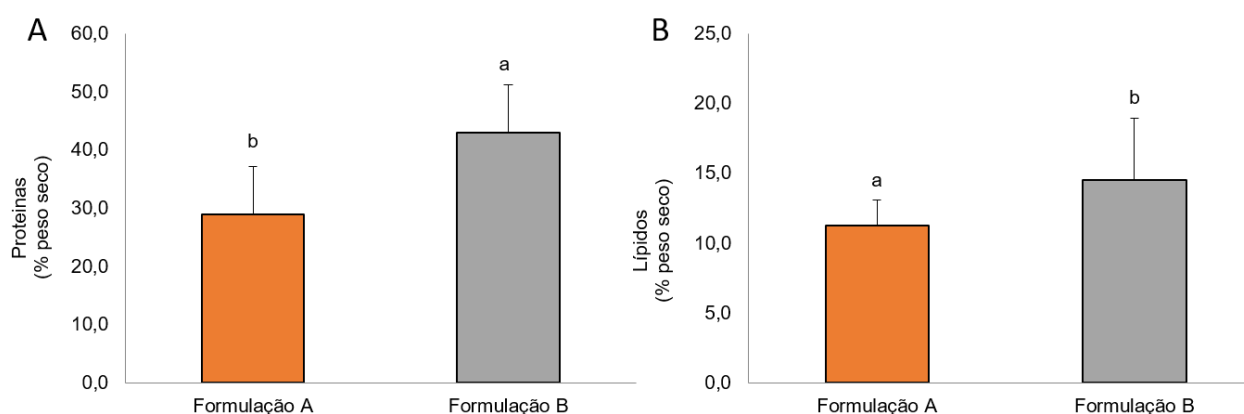
Os resultados das análises sensoriais foram avaliados com base em método descritivo pelo que não foram alvo de tratamento estatístico.

Verificaram-se para os dados associados à caracterização do conteúdo proteico, lipídico e microbiológico a normalidade e homogeneidade de variância. Realizou-se uma transformação arcsen para todos os dados de análise em percentagem. O tratamento de dados foi realizado através do software IBM SPSS 25.0. A avaliação de diferenças significativas entre tratamentos foi realizada através de one-way ANOVA com teste post hoc Tuckey ( $p < 0,05$ ), de acordo com o número de variáveis independentes presentes no desenho experimental. Os dados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão.

### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterização bioquímica e microbiológica

Com base nos resultados dos vários *batches* de produção, das duas formulações em estudo, foram avaliados os conteúdos proteicos e lipídicos, expresso em percentagem de peso seco, no T0 (durante o primeiro mês após a produção).

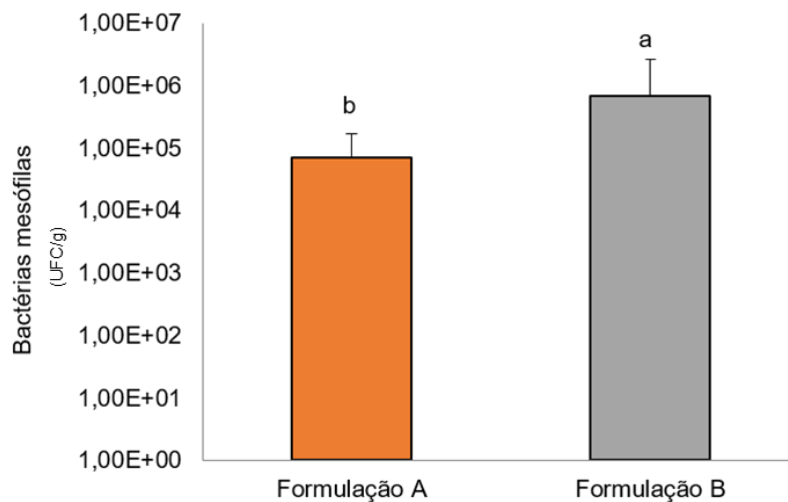


**Figura 3.1** - Caracterização bioquímica, expresso em percentagem de peso seco, nas formulações A (n=22) e B (n=15): A) conteúdo proteico; B) conteúdo lipídico. Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre *batches* encontram-se representadas através de letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0.05$ ).

Os resultados obtidos indicam que a formulação B, indicada para o cultivo de rotíferos em sistema RAS, apresenta significativamente maior percentagem de proteínas comparativamente à formulação A, a qual foi desenvolvida para a produção de rotíferos em modo de *batches*, média de 43,1% PS e 29,0% PS, respetivamente.

Quanto à análise do conteúdo lipídico, também a formulação B apresentam resultados significativamente superiores comparativamente com a formulação A, tendo-se registado uma média de 14,5% PS e 11,2% PS.

Ao nível da análise microbiológica no T0, no que diz respeito à quantificação das bactérias mesófilas (expressa em número de unidades formadoras de colónias por grama de produto analisado (UFC/g)), constatou-se que nos vários *batches* analisados, a formulação B apresenta maior carga microbiana, média de  $2,8 \times 10^5$  UFC/g (n=18), sendo que na formulação A, a média foi de  $6,9 \times 10^4$  UFC/g (n=24).

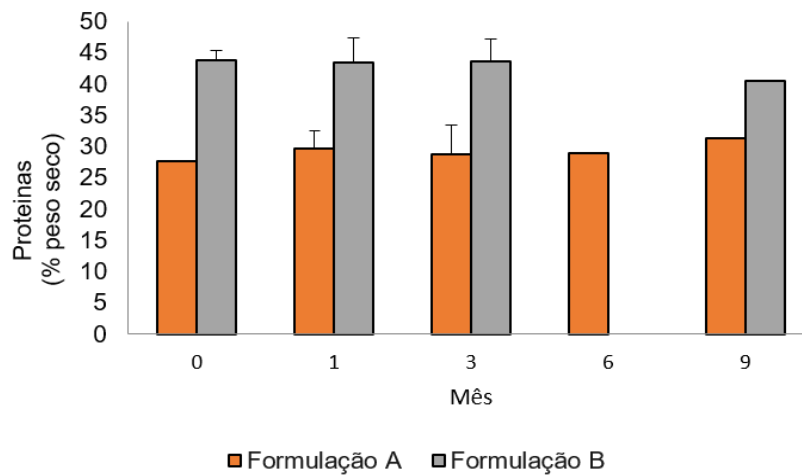


**Figura 3.2** - Caracterização microbiológica, através da quantificação de bactérias mesófilas, nas formulações A (n=24) e B (n=18). Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre batches encontram-se representadas através de letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Por forma a quantificar as variações durante o tempo de prateleira dos dois produtos, e de acordo com a Figura 2.1 (desenho experimental), as Figuras 3.3, 3.4 e 3.5 representa os valores obtidos quer na avaliação bioquímica (conteúdo de proteínas e lípidos em % de PS) quer na avaliação microbiológica (unidades formadoras de colónias por grama de produto – UFC/g).

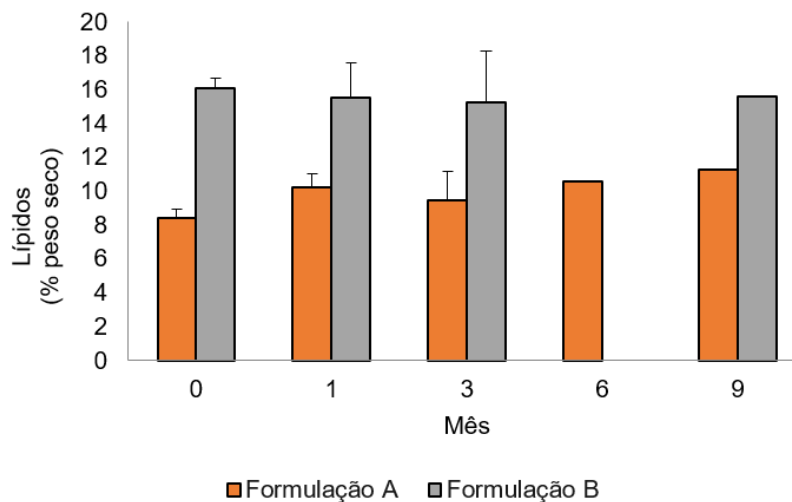
Por questões técnicas, em particular o número de réplicas de amostras disponíveis, foi necessário reduzir um dos pontos de amostragem de análise na formulação B. Por forma a minimizar o impacto desta situação, na análise dos dados, optou-se por não efetuar a análise no T6, motivo pelo qual o mesmo não se encontra representado nas Figuras 3.3, 3.4 e 3.5.

Analisando os dados representados na Figura 3.3, constatamos que não existiram diferenças significativas no conteúdo de proteínas, ao longo do tempo de prateleira, quer na formulação A quer na formulação B, considerando que os desvios identificados se podem relacionar com o erro associado ao método analítico. Com a média de proteínas de 29% na formulação A e de 43% na formulação B. Valores estes bastante semelhantes aos obtidos na análise de todos os *batches* produzidos até à data deste estudo (setembro/2023).



**Figura 3.3** - Caracterização bioquímica, através da determinação do conteúdo proteico, expresso em percentagem de peso seco, nas formulações A (n=9) e B (n=4), ao longo dos meses de armazenamento em congelação. Os dados representam médias e desvios padrões (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Também no que diz respeito aos dados obtidos da quantificação do conteúdo lipídico ao longo do tempo de prateleira, estes são análogos aos resultados obtidos pela análise estatística de todos os *batches* produzidos. Existindo uma maior percentagem de lípidos na formulação B (média de 16% PS) comparativamente com a formulação A (média 10% PS). Não foi possível identificar uma linearidade nas variações obtidas entre cada ponto de amostragem, pelo que mais uma vez, as mesmas podem estar relacionadas ao erro do método/incerteza analítica.



**Figura 3.4** - Caracterização bioquímica, através da determinação do conteúdo lipídico, expresso em percentagem de peso seco, nas formulações A (n=9) e B (n=4), ao longo dos meses de armazenamento em congelação. Os dados representam médias e desvios padrões (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

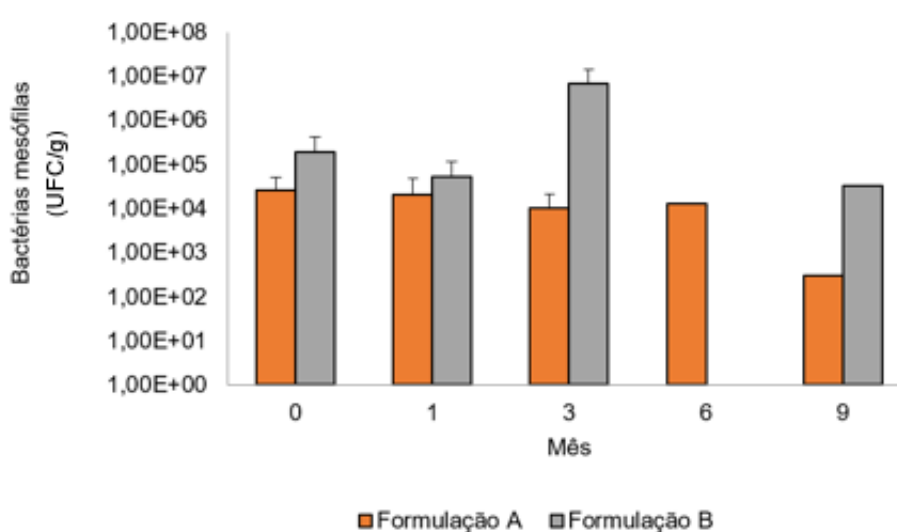
A análise dos resultados obtidos, para ambas as formulações, não demonstraram variações significativas entre a percentagem de lípidos entre o T0 e o T9 (9 meses de armazenamento em congelação).

Outro dos parâmetros avaliados no T0, relaciona o conteúdo de cinzas no produto, com elevada relevância, uma vez que a utilização de solução salina irá contribuir para a presença de maior quantidade de sais inorgânicos na formulação A, uma vez que existem diferenças de salinidade (35 ppt *versus* 200 ppt). A tabela 3.1 representa os resultados obtidos, os quais confirmam esta relação.

**Tabela 3.1** – Caracterização bioquímica, pela quantificação do conteúdo cinzas inicial, expresso em percentagem de peso seco, para as duas formulações.

Produto	Solução	Cinzas (% PS)
Formulação A	Hipersalina 200 ppt	30,6
Formulação B	Salina 35 ppt	18,3

Relativamente às análises microbiológicas, nomeadamente a quantificação de bactérias mesófilas, os resultados analíticos, descrevem uma ligeira redução no número de UFC/g ao longo do tempo de prateleira (conservação em congelação). Sendo esta redução bastante significativa no T9, para a formulação A, com uma redução de  $10^2$  comparativamente com o resultado obtido no T0, (Figura 3.5).



**Figura 3.5** – Caracterização microbiológica, através da quantificação de bactérias mesófilas, nas formulações A (n=9) e B (n=4), ao longo dos meses de armazenamento em congelação. Os dados representam médias e desvios padrões (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Relativamente à formulação B, a análise não é tão clara quanto o esperado, considerando-se que o resultado obtido no T3, possa estar influenciado por um deficiente acondicionamento da amostra, comprometendo a cadeia de frio e o respetivo resultado, não tendo sido efetuada uma contra-análise.

Por outro lado, o facto de não existir análise no T6, dificulta ainda mais a avaliação dos resultados ao longo do tempo de prateleira. Efetuado a análise comparativa apenas entre o T0 e o T9, verifica-se uma ligeira diminuição da carga bacteriana, para ambas as formulações.

**Tabela 3.2** – Caracterização microbiológicas das formulações em estudo, no ponto de amostragem inicial (T0), para microrganismos patogénicos (e.g., *Vibrio* e *Salmonella*) e outros considerados indicadores de boas práticas de produção e higiene (e.g., enterobactérias, fungos e leveduras).

Parâmetro	Unidades	Especificação	Formulação A	Formulação B
<i>Vibrio</i> sp.	P ou A/25g	A/25g	Ausência	Ausência
<i>Salmonella</i> sp.	P ou A/25g	A/25g	Ausência	Ausência
<i>Escherichia coli</i>	UFC/g	ND	<10	<10
Enterobactérias	UFC/g	ND	<10	<10
Fungos	UFC/g	ND	<10	<10
Leveduras	UFC/g	ND	<10	<10

Legenda: A – Ausência; ND – não determinado; P – Presença.

Relativamente à presença de microrganismos das estirpes de *Vibrio* sp., *Salmonella* sp., enterobactérias, *Escherichia coli* ou fungos e leveduras, estas não foram quantificadas ou apresentaram valores inferiores ao limite de quantificação nos produtos em análise, tal como representado na tabela 3.2.

Em relação à quantificação dos metais pesados, os resultados obtidos encontram-se bastante abaixo dos limites definidos pela Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu do Conselho (relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais), tal como representado na tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Caracterização e quantificação dos metais pesados, com base nos limites máximo em mg/kg (ppm) de alimento para um teor de humidade de 12 %, definido na Diretiva 2002/32/CE.

Parâmetro	Unidades	Especificação	Formulação A	Formulação B
Mercúrio	mg/kg	0,1	<0,1	<0,1
Cadmio	mg/kg	1	<0,010	<0,010
Chumbo	mg/kg	10	<0,020	<0,020
Arsénio	mg/kg	2	<0,10	<0,10

### 3.2 Análise sensorial do produto

A análise sensorial foi avaliada com base nos resultados obtidos ao nível do aspeto, da cor e do cheiro, tendo sido utilizada uma classificação de acordo com as alterações identificadas, de acordo com as referenciadas na tabela 2.2.

#### 3.2.1 Análise sensorial do produto - Cor

Todos os *batches* analisados no T0, em ambas as formulações A e B, apresentaram uma cor de acordo com o esperado, através da comparação com a escala de cores RAL (tabela 2.2), tendo sido classificadas com a cor RAL 6035, e no caso da amostra diluída entre o RAL 6001 e RAL 6002.

O resultado das avaliações realizadas após a produção dos vários *batches*, indicam que estes se encontram bastante uniformes em relação à cor (RAL 6025 – verde escuro), não existindo resultados divergentes.



**Figura 3.6** – Amostras de produtos no T0 (RAL 6025), e amostra diluída (RAL 6002).

O resultado das avaliações realizadas após a produção dos vários *batches*, indicam que estes se encontram bastante uniformes em relação à cor (RAL 6025 – verde escuro), não existindo resultados divergentes.

As alterações de cor, apenas foram identificadas ao longo das avaliações realizadas nas amostras mantidas em refrigeração (avaliação da validade secundária), existindo alguns lotes com características conforme apenas durante o período definido nas especificações (30 dias ≈ 4 semanas) e outros lotes que ultrapassaram largamente esse período (superior a 90 dias ≈ 3 meses), desde que mantidas as condições de armazenamento em refrigeração.



**Figura 3.7** – *Degradé* de cores, desde a produção, em resultados das várias semanas de armazenamento em refrigeração, A) exemplo em solução diluídas; B) exemplo nas amostras contidas nos Falcon®, imagem à esquerda representa a cor do produto após produção (T0) e a imagem mais à direita representa a cor do produto totalmente alterada, após vários meses de conservação em refrigeração.

Analisando os resultados obtidos, ao longo dos ensaios do tempo de prateleira, no caso da formulação A, constatou-se que, mesmo decorridas as 4 semanas (aproximadamente 30 dias à temperatura de refrigeração), as variações de cor ou não foram identificadas ou eram ligeiras (RAL 6025 – verde escuro e RAL 6010 – “verde garrafa”), considerando-se conforme as especificações do produto.



**Figura 3.8** – Comparação de soluções diluídas, da formulação A em diferentes pontos de amostragem (T1 + 1 semana e T3 + 4 semanas), ambos com atribuição da classificação 2 - Ligeira alteração das características iniciais do produto, RAL 6010, segundo a tabela 2.2).

No que diz respeito à formulação B, não existiram alterações significativas no período de 24h, após a descongelação e conservação em refrigeração, porém os resultados obtidos nos dias seguintes não foram coerentes, existindo alguns *batches* sem alteração significativa de cor após semanas de conservação refrigeradas, e outros em que as alterações foram visíveis 3 ou 4 dias após a descongelação.



**Figura 3.9** – Comparação de soluções diluídas, da formulação B em diferentes pontos de amostragem (T0 + 1 semana; T1 + 1 semana e T1 + 2 semanas).

### 3.2.2 Análise sensorial do produto – Cheiro

Relativamente às análises de cheiro, constatou-se que na maioria das amostras analisadas, o cheiro se mantém característico durante várias semanas, diminuindo ligeiramente de intensidade nas amostras armazenadas em congelação, como foi o caso das amostras T6 e T9, mas sem colocar em causa a sua conformidade.

Por outro lado, a caracterização de cheiro não conforme, ou seja, cheiro “acidificado”, apenas se verifica em amostras cujo o prazo de validade secundário já se encontra largamente ultrapassado (formulação A > 30 dias, formulação B > 1 dia, ambas mantidas em refrigeração).

Sendo claro que, antes de ser perceptível a degradação ao nível do cheiro, já as amostras se apresentam não conformes, devido à significativa degradação de cor, tornando-se acastanhadas.

### 3.2.3 Análise sensorial do produto – Aspeto

Não se registaram alterações relacionadas com o aspeto, nas amostras colhidas após a produção dos vários batches, nem nas armazenadas em congelação, as quais após descongelarem mantêm o aspeto viscoso característico de ambas as formulações.



**Figura 3.10** – Fotografia do produto em congelação e após descongelação, não se registando alterações no aspeto.

Quando conservadas em refrigeração, em algumas situações, foi possível identificar uma separação de fases/decação do produto, tal como representado na Figura seguinte.



**Figura 3.11** – Pormenor de separação de fases (camada mais líquida à superfície), assim como alteração de cor (verde acastanhado), numa das formulações mantido em refrigeração

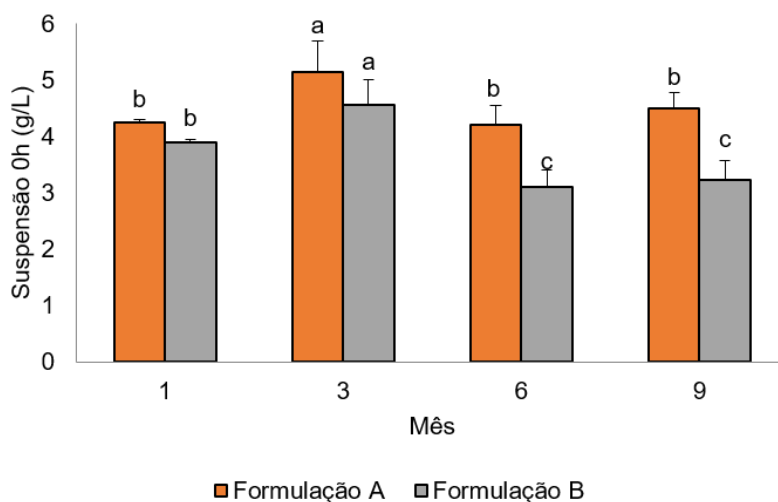
Após a agitação do produto, tal como recomendado nas instruções de utilização, este tornou-se novamente homogéneo e impercetível a separação de fases identificada anteriormente.

## 3.3 Análise de precipitação do produto

---

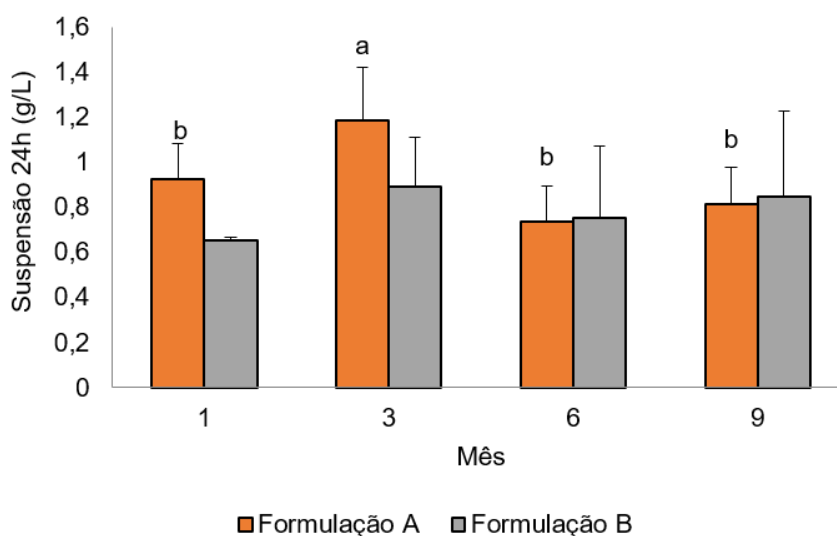
Após a preparação da solução diluída, procedeu-se à análise da capacidade de suspensão dos produtos, tendo-se constatado que em todos os pontos de amostragem analisados, a

formulação A, apresenta uma maior capacidade de suspensão na coluna de água comparativamente com a formulação B, com diferenças significativas no T6 e no T9, tal como representado na Figura 3.12.



**Figura 3.12** – Avaliação da precipitação dos produtos na coluna de água, no momento da preparação da solução diluída (0h), durante o tempo de prateleira dos 2 produtos em análise. Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre tratamentos em cada mês, encontram-se representadas através de diferentes letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

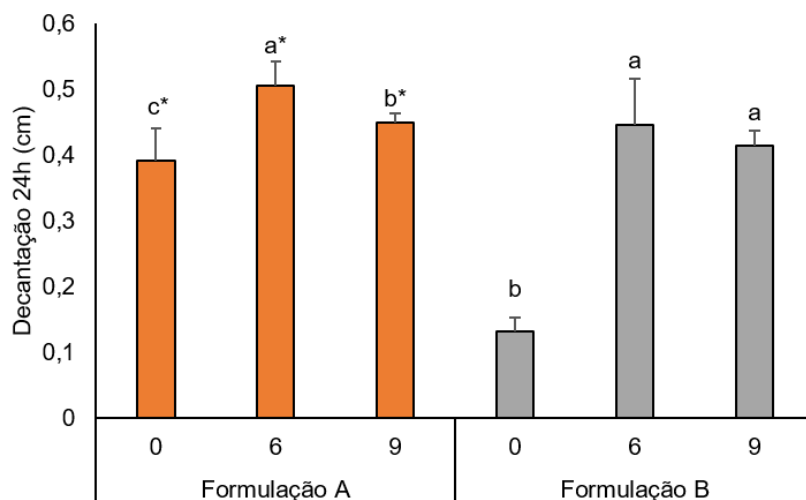
Efetuada a mesma avaliação por espectrofotometria, após 24h da preparação inicial da solução (Figura 3.13), constatou-se que, à semelhança do registado às 0h, a formulação A apresenta melhores resultados de manutenção da capacidade de suspensão na coluna de água. Contudo, registaram-se algumas diferenças significativas entre réplicas da mesma formulação.



**Figura 3.13** – Avaliação da precipitação dos produtos na coluna de água, após 24h em repouso sem agitação, durante o *tempo de prateleira* dos 2 produtos em análise. Os dados representam médias e

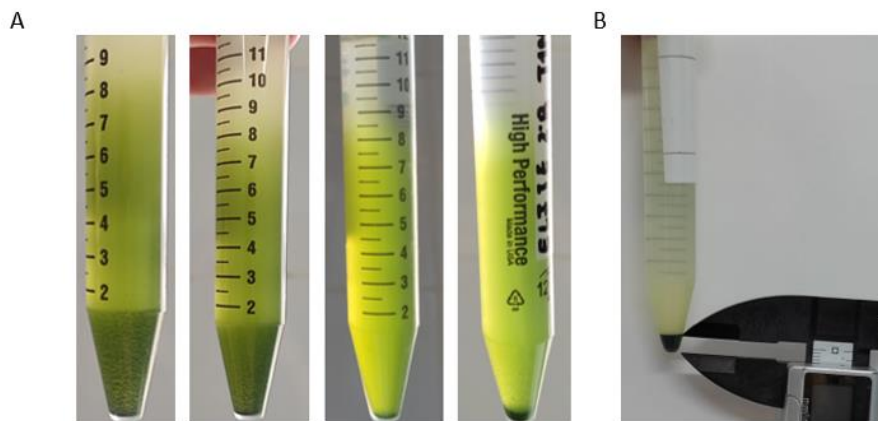
desvios padrões e as diferenças significativas entre tratamentos em cada mês, encontram-se representadas através de diferentes letras (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Na Figura 3.14, encontra-se representada a dimensão do *pellet* formado às 24h para as 2 formulações, sendo que para a formulação A, registaram-se algumas diferenças entre réplicas e entre meses. No caso da formulação B, constatou-se um aumento significativo do tamanho do *pellet* do T0 para o T6 e T9.



**Figura 3.14** – Avaliação da precipitação dos produtos na coluna de água, após 24h em repouso sem agitação, durante o *tempo de prateleira* dos 2 produtos em análise. Os dados representam médias e desvios padrões e as diferenças significativas entre os meses analisados para a mesma formulação, encontram-se representadas através de diferentes letras e os asteriscos as diferenças entre tratamentos no mesmo mês (One-way ANOVA, post hoc Tuckey,  $p < 0,05$ ).

Outra das metodologias implementada na empresa, para avaliar a capacidade de suspensão dos produtos, relaciona-se com a medição do tamanho do *pellet* formado após 24h, na Figura 3.15 A é possível visualizar através das fotografias o processo de decantação ao longo do tempo (24h), encontrando-se também representado na Figura 3.15 B, o modo como foi efetuada a medição do *pellet*, com o auxílio de um paquímetro.



**Figura 3.15** – A) Processo de decantação registrado fotograficamente ao longo das 24h; B) Medição do pellet formado após 24h de repouso, à temperatura ambiente, através da utilização de um paquímetro digital.

## 4. Discussão

---

A utilização de microalgas vivas, por parte do setor da aquacultura, encontra-se neste momento a ter alternativas bastante interessantes, quer a nível dos custos operacionais, quer a nível da qualidade dos mesmos, através da utilização de produtos de microalgas produzidas industrialmente, sob as mais variadas formas (e.g., pasta congeladas, produtos secos e concentrados líquidos).

Com a utilização destes produtos comerciais, pretende-se a substituição da alga viva, não só para o cultivo de rotíferos, como também para a “técnica de água verde”, a qual é utilizada no cultivo de peixes marinhos, contribuindo para a preservação da qualidade nutricional das presas vivas (e.g., rotíferos), permitindo ainda mudanças no contraste visual do meio e na sua composição química (Makridis & Olsen, 1999).

A microalga *Nannochloropsis sp.* é o género mais utilizado para o cultivo de rotíferos, possuindo um perfil nutricional adequado, e porque devido às suas reduzidas dimensões, permite manter-se na coluna de água durante muito tempo (“técnica de água verde” em larvas marinhas), tanto na sua utilização viva, como na utilização de produtos comerciais, como é o caso das formulações em concentrados líquidos *ready-to-use*.

O desenvolvimento de novos produtos, apresenta alguns desafios, alguns deles associados à qualidade do produto (método de produção, conservação, utilização), aos custos (custo da matéria-prima, material embalagem, acondicionamento/transporte) e à adequação ao objetivo proposto, de forma a alcançar as expectativas dos clientes.

A Necton, S.A., identificou junto dos seus clientes a necessidade de desenvolver produtos com baixa carga bacteriana, menor decantação e maior capacidade de suspensão na água. Estas necessidades foram supridas através do desenvolvimento de dois novos produtos:

- a) **Formulação A** - apresenta uma redução significativa de carga microbiana para cultivo de rotíferos em *batch*, tal como é realizado em sistemas de cultivo fechado standard de forma a controlar o crescimento bacteriano que afeta negativamente o crescimento de rotíferos e contamina posteriormente o cultivo de larvas de peixe. Este produto apresenta um tempo de prateleira pós descongelação de 1 mês refrigerado uma vez que essa é a necessidade do ponto de vista do utilizador deste produto.

- b) **Formulação B** - desenvolvido para cultivo de rotíferos em sistemas *RAS*, utilizado no regime de produção semi-contínuo, que requer elevada dispersão na água, muito pouca decantação e necessita de evitar a colmatação dos filtros deste sistema de aquacultura. Este objetivo foi alcançado através da redução da salinidade do produto (35 ppt) e do seu peso seco (15 % PS). Pelas características da formulação desenvolvida, constatou-se que, durante a conservação em refrigeração, existem algumas alterações, nomeadamente ao nível sensorial (cor, aspeto, cheiro), por esse motivo existiu a necessidade avaliar o tempo de validade secundária, por forma a não comprometer a qualidade do produto e as expectativas do cliente.

Um produto congelado pode sofrer, ao longo do seu tempo de armazenamento, alterações de origem física, química, microbiológica e sensorial. Estas alterações, quando o armazenamento é efetuado de uma forma adequada (Clemmings et al., 2010), não devem afetar a conformidade do produto, o que se comprovou com os resultados obtidos nos vários ensaios, uma vez que não foram identificadas diferenças significativas ao longo dos pontos de amostragem analisados.

Atualmente, a indústria alimentar recorre com frequência à adição de substâncias químicas para o fabrico, processamento e conservação de alimentos. Essas substâncias, conhecidas como aditivos alimentares, são intencionalmente adicionadas aos alimentos com objetivos diversos e bem definidos tais como prevenir o crescimento microbiano (conservantes) ou permitir o fabrico de produtos adequados a determinados grupos de consumidores (edulcorantes não calóricos).

A utilização de sal, continua a ser um dos melhores métodos para inibir o crescimento e a sobrevivência de microrganismos indesejáveis. Embora os avanços modernos nas técnicas de armazenamento e embalagem de alimentos e a velocidade de transporte tenham diminuído em grande parte este papel, o sal continua a ser amplamente utilizado para prevenir a deterioração rápida (e assim prolongar o prazo de validade do produto), criando um ambiente inóspito, permitindo controlar os níveis microbiológicos dos produtos (Albarracín et al., 2011).

Tal como na indústria alimentar, no desenvolvimento de novos produtos, dependendo das condições de armazenamento propostas e do prazo de validade desejado, a empresa avalia a necessidade de incorporar na formulação, no início do processo, ingredientes conhecidos por controlar vários aspetos da degradação dos produtos, como é o caso da utilização de

elevadas concentrações de sal, o qual desempenha a função de conservante, uma vez que a sua adição permite a diminuição do conteúdo de água e conseqüentemente o crescimento de espécies bacterianas (Albarracín et al., 2011; Durack et al., 2008). Para além disso, o sal está envolvido no desenvolvimento ou inibição de algumas reações enzimáticas nos alimentos, as quais estão associadas a algumas das características sensoriais dos produtos, tais como a textura, cor, sabor e aroma (Albarracín et al., 2011).

Com base nos resultados obtidos, e comparando as duas formulações, que apresentam concentrações bastante distintas de salinidade (35 ppt *versus* 200 ppt), constatou-se esse efeito positivo no prazo de conservação do produto aquando da sua manutenção em refrigeração, pois a formulação com maior teor de sal, mantém as suas características inalteradas por um período bastante superior à outra formulação. Em relação ao armazenamento em congelação, não existiram diferenças significativas entre as duas formulações, eventualmente porque as temperaturas (< -18°C) terão um efeito primordial comparativamente com a utilização de conservantes (sal), na estabilidade dos produtos em estudo.

Dependendo do produto, do processo e das condições de armazenamento, o prazo de validade microbiológico pode ser determinado pelo crescimento de microrganismos e por alteração das características iniciais do produto. Os métodos tradicionais para a determinação do prazo de validade incluem o armazenamento do produto a diferentes temperaturas e a determinação da deterioração por avaliação sensorial e contagem microbiana (Kilcast and Subramaniam, 2000), em tempo real ou através de método acelerado, porém este último, por apresentar custos elevados, normalmente não é a metodologia selecionada.

Considerando que os produtos em estudo neste relatório, foi efetuada uma caracterização do tempo de prateleira, para os produtos formulados, na gama dos concentrados líquidos, quer para a confirmação do prazo de validade primário (9 meses), como para o validade secundária, ou seja, a validade atribuída após abertura da embalagem, de forma a avaliar se as características se mantinham inalteradas durante esse período, nomeadamente as que eram visíveis a olho nu (sensoriais e de precipitação) e as que necessitavam de uma caracterização microbiológica e bioquímica.

## **4.2 Caracterização da composição bioquímica e microbiológica**

---

Existem dois aspetos importantes a ter em conta na determinação da estabilidade microbiológica de um produto, um deles está relacionado com o crescimento microbiano, que leva à sua deterioração, em particular o crescimento de microrganismos patogénicos que afetam a segurança do produto (Kilcast and Subramaniam, 2000), e a estabilidade bioquímica do mesmo.

O crescimento de um microrganismo específico durante a armazenagem depende de vários fatores, podendo destacar entre outros, a carga microbiana inicial, as propriedades físico-químicas intrínsecas, o método de processamento utilizado na produção e a temperatura de conservação/armazenagem (Kilcast and Subramaniam, 2000).

A carga microbiológica inicial, da matéria-prima utilizada para a produção de cada formulação, irá repercutir-se no produto final, sendo por isso essencial implementar processos de produção que permitam a sua redução (e.g., centrifugação e posterior refrigeração/congelação da biomassa antes da formulação), uma vez que o cultivo de microalgas por autotrofia não é realizado em modo axénico, existe uma microbiota associada a cada microalga.

Tendo por base que as cargas bacterianas dos cultivos auxiliares (e.g., rotíferos) influenciam o desenvolvimento das larvas de peixes marinhos, é fundamental implementar técnicas para minimizar os riscos bacteriológicos (Dhert et al., 2001). Por outro lado, as colonizações de bactérias agregadas às células de microalgas destroem o material das células, resultando na formação de partículas (detritos) que tendem a sedimentar (Kogure et al., 1982), traduzindo-se num produto com qualidade inferior e com impacto no sucesso do cultivo de rotíferos.

Na produção de rotíferos em regime semi-contínuo atingem-se levadas densidades, mantendo-se durante longos períodos de produção, o que conduz eventualmente a um aumento de carga microbiológica nos tanques de cultivo (Kostopoulou et al., 2012). O crescimento de bactérias excessivo causa problemas no cultivo de rotíferos, resultando na supressão de crescimento e origem de patologias em rotíferos que são prejudiciais na nutrição das larvas de peixes marinhos, assim como para o seu cultivo, resultando em sobrevivência e crescimento deficientes (Verschuere et al., 2000).

Assim, é essencial a aplicação de metodologias adequadas para reduzir e/ou controlar a carga bacteriológica desenvolvida no cultivo de rotíferos (Dhert et al., 2001), nomeadamente no desenvolvimento de formulações otimizadas aos vários sistemas, como é o caso das formulações em estudo no presente relatório.

Para a avaliação da qualidade microbiológica dos produtos em estudo, e uma vez que para esta tipologia de produtos (concentrados líquidos de microalgas para alimentação animal) não existe, à data limites legalmente estabelecidos, foram considerados os limites definidos internamente nas respetivas especificações dos produtos, baseados ou no histórico da própria empresa ou nos requisitos de clientes.

Os resultados da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (Figura 3.2), no momento da formulação (análises realizadas após a produção, máximo 2 semana em congelação), encontram-se dentro dos limites atribuídos internamente nas especificações atuais, para ambas as formulações (A e B), o que espelha a eficácia de todo o processo de produção, assim como de todas as boas práticas associadas ao manuseamento e armazenamento dos produtos e das matérias-primas, por parte dos operadores da empresa.

Tal como referido anteriormente, a avaliação do número de microrganismos mesófilos, é uma avaliação qualitativa, mas não específica, pois não fornece detalhes sobre a patogenicidade, contudo é bastante representativa das condições em que os produtos serão utilizados, uma vez que, habitualmente o protocolo do cultivo de rotíferos menciona temperaturas na ordem dos 22 - 28°C (Kostopoulou, 2012).

O desenvolvimento de microrganismos patogénicos, como é o caso de algumas espécies de bactérias dos géneros *Salmonella* e *Vibrio*, ambas pertencentes à família Enterobacteriaceae. não será necessariamente acompanhado de alterações na aparência, cheiro ou textura, que possam ser detetados por uma análise sensorial (Kilcast and Subramaniam, 2000).

De forma a avaliar a possível presença de microrganismos patogénicos, foram realizadas análise de alguns microrganismos específicos, tal como representado na tabela 3.2. Análises estas, realizadas apenas no T0, pois considera-se que a ausência inicial, garante a inocuidade do produto ao longo do seu tempo de prateleira, desde que garantidas as condições de armazenamento, e utilização recomendadas para o produto.

A formação de fungos e leveduras, frequentemente associados a alterações sensoriais (Kilcast and Subramaniam, 2000), tais como alteração do aspeto e do cheiro/odor, foram também consideradas nas análises (tabela 3.2), não existindo evidências em nenhum dos pontos de amostragem.

A análise de dados, comprova ainda que a temperatura tem um efeito positivo na redução a carga microbiológica (Figura 3.5), observando uma redução ao longo do tempo de conservação em congelação, tal como reportado em outros estudos (e.g., Verspreet et al., 2020). No caso da formulação A, essa redução é bastante vivível, comparando o resultado obtido no T0 com o valor no T9. Porém, na formulação B, os dados indicam uma redução microbiológica entre o T0 e o T1 e novamente entre o T0 e T9. Porém, o resultado obtido na avaliação ao T3, não se encontra dentro dos valores esperados, uma vez que não foi possível realizar uma contra-análise, considera-se que o valor poderá estar afetado pelas condições de transporte da amostra para o laboratório (análise externa em laboratório subcontratado), eventualmente um abuso de temperatura, uma vez que o envio da amostra em causa, foi efetuado no mês de agosto, além disso, por questões técnicas não foi possível enviar a amostra correspondente ao período T6, o qual poderia ajudar na interpretação dos resultados obtidos.

Assim, todos os resultados microbiológicos obtidos comprovam a inocuidade dos produtos e respetiva segurança para a sua utilização em aquacultura, ao longo de todo o tempo de prateleira dos produtos em estudo, salvaguardando sempre a manutenção das condições de temperatura indicadas nas respetivas especificações e rótulos dos produtos.

Alguns estudos realizados também com microalgas (Camacho et al., 2016), demonstraram que a refrigeração não afeta os ácidos gordos nem a viabilidade celular, após 2 meses de armazenamento, e que deverá existir uma estabilidade do perfil bioquímico durante o período de armazenagem. Informação que corrobora com os resultados obtidos, para ambas as formulações (Figuras 3.3 e 3.4), não se registaram variações significativas, entre a percentagem do conteúdo proteico e lipídico durante o tempo de prateleira analisado (9 meses de armazenamento em congelação), para ambas as formulações.

Outro aspeto analisado, associado à caracterização bioquímica das formulações A e B, está relacionado com a estabilidade da sua composição, ou seja, os clientes pretendem adquirir produtos comerciais sem grande variabilidade, o que poderá não ser obtido aquando da

utilização de alga viva. Os resultados obtidos na caracterização bioquímica (Figura 3.1), indicam essa mesma estabilidade para os vários lotes produzidos. Realçar que as formulações são distintas, e que o conteúdo de sal terá influência nos valores obtidos, uma vez que os mesmos estão expressos em % PS, para o qual o teor de cinzas obtido também entrará na equação, tal como se encontra referido na tabela 3.1, em que a formulação A (200 ppt) apresenta um teor de cinzas superior ao da formulação B (35 ppt), tal como era expectável. Ainda assim, considera-se que a utilização da solução salina contribui positivamente para a estabilidade do produto e adequação às expectativas dos clientes, pois permite a aquisição e conservação do produto de acordo com as necessidades da tecnologia utilizada para o cultivo de rotíferos e “técnica de água verde”.

### **4.3 Análise sensorial do produto**

---

A análise sensorial torna-se fundamental neste conjunto de análises, pois permite complementar os resultados obtidos pelas análises físico-químicas e microbiológicas, associadas à validação do tempo de prateleira definido:

- a) validade primária - Formulação A e B: 9 meses em congelação;
- b) validade secundária - Formulação A: 30 dias e Formulação B: 24h, ambas em refrigeração.

Em ensaios realizados anteriormente na empresa, foi possível avaliar o impacto da salinidade no comportamento físico-químico nos concentrados líquidos de microalgas, tendo a aplicação da solução salina de 200ppt permitido conservar adequadamente o produto por um período mais prolongado, em relação a uma solução de menor salinidade, isto no caso da validade secundária (período de conservação em refrigeração).

#### **3.2.1 Análise sensorial do produto - Cor**

A aparência visual de um produto, manifestada pela sua cor, tem uma forte influência na opinião sobre a qualidade do produto. Estudo na área alimentar, indicam que a alteração de cor de um produto pode ser correlacionada com a perda de alguns dos atributos de qualidade, tais como alterações nutricionais e a perda de frescura (Phatare et al., 2013)

A cor é um fenómeno percetivo que depende do observador e das condições em que é observada, porém as cores não características do produto, poderão ser indicativas de perda

de frescura/deterioração (Phatare et al., 2013). Esta avaliação visual da cor, por meio dos sentidos (Meléndez-Martínez et al., 2005), envolver a observação de uma amostra sem instrumentos de medição, observando-a e comparando-a com padrões de cor definidos, em condições de iluminação idênticas. As medições visuais de cor, são frequentemente efetuadas com base em diferentes índices de cor, os mais usuais são o RGB (vermelho, verde e azul), utilizado em monitores de vídeo e a escalas de cores, que incluem todas as tonalidades e intensidades possíveis das diferentes cores, com a atribuição de um número a cada ponto da escala (Phatare et al., 2013).

Não existindo na empresa nenhum equipamento específico para medição da cor (e.g., colorímetro), a avaliação da cor das amostras, foi efetuada por avaliação visual, com recurso a uma escala de cores, tal como representada na Figura 2.2, e respetiva comparação com a amostra padrão, por forma a diminuir a subjetividade deste método, o qual se encontra sujeito à percepção de cada indivíduo.

Todas as avaliações realizadas após a produção dos vários *batches*, (registadas em modelo próprio da empresa – ficha de produção) apresentam-se bastante uniformes (RAL 6025 – verde escuro), não existindo resultados divergentes. As alterações de cor, apenas foram identificadas ao longo das avaliações realizadas nas amostras mantidas em refrigeração (avaliação da validade secundária), as quais deverão estar associadas à degradação de pigmentos fotossintéticos (e.g., clorofilas que se degradam em feofitinas), por reações oxidativas (Ahvenainen, 1996).

Os resultados obtidos no caso da formulação A indicam que, mesmo decorridas as 4 semanas (aproximadamente 30 dias à temperatura de 4°C), as variações de cor ou não foram identificadas ou eram ligeiras (RAL 6025 e RAL 6017), considerando-se conforme as especificações do produto (Figura 3.8).

No que diz respeito à formulação B, não existiram alterações significativas no período de 24h, após a descongelação e conservação em refrigeração, porém os resultados obtidos nos dias seguintes não foram coerentes, existindo alguns *batches* sem alteração de cor após semanas de conservação refrigeradas, e outros em que as alterações foram visíveis 3 ou 4 dias após a descongelação (Figura 3.9). Tratando-se de uma formulação com baixo teor de sal, comparativamente com a formulação A, a temperatura é um fator determinante na manutenção da qualidade e características do produto. Sabendo que, nem sempre é possível

garantir a cadeia de frio durante a conservação dos produtos e com base nos resultados obtidos, a empresa manteve o prazo de validade de 9 meses em congelação, mas considerou como prazo de validade secundária (conservação em refrigeração, após abertura da embalagem) apenas 24h (1 dia), por forma a salvaguardar a qualidade do produto até ao momento da sua utilização.

Relativamente à formulação A, o teor de sal elevado terá um efeito conservante (200 ppt), permitindo a manutenção das características do produto por um período mais alargado.

### 3.2.2 Análise sensorial do produto – Cheiro

As microalgas têm um odor forte e específico (Durme et al., 2013), mas, tanto quanto sabemos, existe pouca informação sobre a forma como este se altera durante o armazenamento. É evidente que vários metabolitos com um odor desagradável são libertados durante longos períodos de armazenamento, em particular se as condições de conservação não forem adequadas (Verspreet et al., 2020), estando na maioria das vezes associados a alterações microbiológicas que promovem a libertação de compostos.

Verspreet (2020), em ensaios realizados também com a microalga *Nannochloropsis sp.*, identificou a presença de alguns ácidos orgânicos, entre os quais o ácido acético e o ácido propiónico, como responsáveis pelo cheiro desagradável, em amostras mantidas a diferentes temperaturas (e.g., 4°C, 8°C e 20°C). À semelhança desses resultados reportados (Verspreet, 2020), as análises em estudo no presente relatório, também demonstraram algumas variações de cheiro, mas apenas após longos períodos de conservação à temperatura de refrigeração, eventualmente porque a carga microbiana inicial ser relativamente baixa, pelo efeito conservante do sal e porque se tratava de temperaturas relativamente baixas.

No caso das amostras mantidas em congelação, e que foram analisadas em diferentes pontos de amostragem, em nenhuma delas se verificou alterações ao nível do cheiro, aquando a sua descongelação, pelo que se considera que esta propriedade não sofre alterações com o armazenamento em congelação.

### 3.2.3 Análise sensorial do produto – Aspeto

O aspeto geral característico desta gama de produtos (líquido viscoso de cor verde) manteve-se inalterado durante todos os pontos de amostragem e decorridos os períodos indicados para a sua conservação em refrigeração.

Uma vez que, uma das caracterizações pretendidas estava associada à possibilidade de extensão do prazo de validade secundário (após descongelação), as amostras foram mantidas durante várias semanas em refrigeração. Apenas nestas situações foi possível visualizar alterações ao nível do aspeto, com a formação de uma fase mais líquida à superfície, tal como representado na Figura 3.11. De forma a colmatar esta possível alteração, e promovendo a homogeneidade do produto antes da sua utilização, existe a indicação na rotulagem dos produtos, que os mesmos devem ser agitados diariamente, prevenindo possíveis decantações e/ou separação de fase líquida (solução salina) da fase sólida (biomassa da microalga).

## **4.3 Análise de precipitação do produto**

---

Na avaliação de produtos para aquacultura é essencial a avaliação do comportamento do produto simulando a sua aplicabilidade, ou seja, quando efetuada a sua suspensão na água, uma vez que se pretende obter um produto com elevada capacidade de suspensão de forma duradoura, mantendo disponível o alimento para os rotíferos ao longo do tempo (Sales et al.,2019).

Considera-se de elevada relevância a avaliação e quantificação da formação de aglomerados de microalgas, pois os mesmo terão impacto na eficácia de aplicação dos produtos em aquacultura, visto que quanto a formação de aglomerados de microalgas, promove a precipitação do produto e a diminuição da taxa de ingestão, o que se traduz num aspeto negativo, com formação de resíduos no fundo do tanque, diminuição da qualidade da água e custos associados ao desperdício, com particular impacto no cultivos em sistema RAS.

A Necton, S.A. já iniciou o desenvolvimento de metodologias de quantificação e dimensionamento de aglomerados de microalgas, nas suas formulações, porém trata-se de uma metodologia que necessita de otimização, pois envolve ainda protocolos pouco

otimizados e bastante morosos. Apesar de já terem sido testados diferentes metodologias para avaliação e quantificação dos aglomerados (Costa, 2022), nomeadamente por quantificação em câmara de *Neubauer* e com análise de captura de imagem através de software (*Imagej* e *ZEN 2.6*), considera-se necessário um aperfeiçoamento da metodologia, por forma a diminuir os constrangimentos relacionados com a fiabilidade do método (variações associadas a erro humano) e redução do tempo necessário para a realização desta avaliação por cada amostra, por forma a incorporá-la como ponto de controlo nos procedimentos internos de validação de produtos.

A taxa de sedimentação está relacionada com o tamanho e densidade das partículas presentes no meio envolvente (Al-Sammaraee et al., 2009). A formulação B, apresentou menor sedimentação no T0, comparativamente com a formulação A, no entanto não se verificaram diferenças significativas, entre formulações nas avaliações realizadas no T6 e T9, tal como esquematizado nas Figuras 3.12 e 3.13. Através dos resultados obtidos, a diferença na sedimentação dos produtos poderá ser justificada pela diferença ao nível da solução salina (200 ppt e 35 ppt), que se encontra associada à aglomeração de microalgas na presença de diferentes salinidades e também pelas diferenças na composição iónica das soluções salinas utilizadas em cada uma das formulações. Este fator é particularmente relevante em concentrados líquidos de *Nannochloropsis sp.*, devido às suas reduzidas dimensões, apresentam elevada área superficial (relação área volume) e maiores tensões entre partículas.

A composição química do sal adicionado aos concentrados líquidos de microalgas é crucial para a dinâmica das células de microalgas, uma vez que a presença de concentrações elevadas de iões de carga positiva como de cálcio ( $Ca_2^+$ ) e magnésio ( $Mg_2^+$ ) podem neutralizar os grupos na superfície celular que são aceptores de eletrões, diminuindo a magnitude de aceitação de eletrões da superfície e naturalmente aumentam o carácter hidrofóbico das células de microalgas (Ozkan et al., 2013). Este efeito tem um enorme impacto nas espécies de microalgas de água salgada suspensas em soluções com elevada concentração destes iões (Ozkan et al., 2013).

A concentração de sal é conhecida por afetar o crescimento e a fisiologia de várias espécies de microalgas e deve, portanto, ser considerada como uma variável que influencia a fluabilidade celular e, portanto, as taxas de sedimentação das células de microalgas (Roik et al., 2016). Por um lado, pode-se considerar que um meio de maior densidade, fornecido

pelo aumento das concentrações de sal, causaria uma menor taxa de sedimentação devido a uma maior flutuabilidade da célula (Trovão et al., 2019). Contudo, concentrações mais altas de NaCl podem induzir velocidades de sedimentação mais rápidas em microalgas porque a força iónica de soluções salinas pode afetar as cargas negativas da superfície da célula.

Recomenda-se a realização de mais estudos, relativamente à relação entre salinidade e taxa de sedimentação, uma vez que com o aumento da salinidade tende a aumentar a floculação das partículas no meio (Ou et al., 2016), o que poderá comprometer a eficácia dos produtos.

A sedimentação da biomassa de microalgas é um parâmetro fundamental na avaliação da qualidade do produto, uma vez que elevadas taxas de sedimentação das partículas contribuem para a acumulação de alimento no fundo do tanque, o que conduz à oxidação (consumo de oxigénio) produzindo amónia tóxica para os animais e deteriorando a qualidade da água (Han et al., 2022; Sales et al., 2019; Supajaruwong et al., 2021).

Uma maior percentagem de precipitados do produto após 24h, associada também à formação de maior *pellet*, terá impacto na manutenção da qualidade da água dos tanques de cultivo larvar, em particular nos sistemas RAS, pois poderá promover a acumulação de detritos e consequente colmatação dos filtros do sistema, com influência nos níveis de amónia e carga microbiana e respetiva diminuição das taxas de ingestão.

Produtos que originam menor precipitação promovem maior disponibilidade de alimento na coluna de água, potenciando maior ingestão por parte dos rotíferos e consequentemente aumento na produtividade versus o consumo (gastos associados à administração de alimento), considerando que ambas as formulações representam uma elevada qualidade e funcionalidade quer no cultivo em sistema *batch* quer em sistemas semi-contínuos (e.g., RAS).

## 5. Conclusão

---

Através do presente relatório foi possível efetuar a caracterização do tempo de prateleira, através da avaliação da qualidade dois produtos da gama dos concentrados líquidos de microalgas, utilizando alguns dos protocolos internos e através da caracterização bioquímica e microbiológica por análises em laboratório subcontratado.

Ambas as formulações têm definidos como prazo de validade, um período de 9 meses em congelação (validade primária), porém a formulação B, tem indicação para ser utilizada em 24h após descongelação e a formulação A 30 dias, desde que mantidas as condições de refrigeração em ambos os casos (validade secundária), de modo a garantir que as propriedades do produto se mantêm inalteradas.

No desenvolvimento de novos produtos, as amostras a serem testadas, devem ser produzidas exatamente da mesma forma, e se possível com o mesmo equipamento que será utilizado durante a produção à escala industrial, devendo ainda ser considerados os tempos de produção, pois à escala piloto estes podem ser menores e não ser representativo do processo e dos possíveis impactos na avaliação final do produto.

Todos os testes realizados devem ter em conta, tanto o prazo de validade atribuído à embalagem fechada (validade primária), assim como quaisquer instruções de utilização que se apliquem depois da embalagem ter sido aberta, nomeadamente o modo de conservação e período recomendado para a sua utilização (validade secundária).

Os estudos de vida útil acelerados são estudos muito versáteis, e permitem a comparação de diferentes ambientes e condições em estudo. Contudo, não sendo uma representação exata da realidade poderão existir alguns erros associados. Idealmente, os dados relativos a 3 lotes são essenciais para corroborar os resultados, nomeadamente do prazo de validade dos produtos, porém em algumas situações é aceitável os resultados de apenas 1 lote, baseado no histórico, características do produto e revisões bibliográficas relacionadas com a mesma categoria de produtos.

As várias formulações e/ou produtos desenvolvido na empresa, são avaliados continuamente, existindo ainda um acompanhamento regular da satisfação dos clientes, a qual também permite aferir a necessidade de alteração/ajuste, com vista à obtenção de produtos de alta

qualidade e performance, permitindo o aumento de competitividade com as empresas concorrentes.

A empresa Necton, S.A. apresenta uma base sólida ao nível das boas práticas de processo e requisitos de qualidade, o que de alguma forma permite que todos os processos de design e desenvolvimento de novos produtos, sejam planeados e executados cuidadosamente numa perspetiva de melhoria contínua, demonstrando a viabilidade prática da utilização de um produto de microalgas num só passo, fácil de usar, permitindo uma maior flexibilidade na gestão da produção e garantido uma elevada qualidade

As análises sensoriais efetuadas demonstram que as amostras com 1 mês de armazenamento e com 9 meses de armazenamento, em congelação, foram consideradas sensorialmente semelhantes.

Em relação à validade secundária atribuída às formulações em estudo, os resultados foram bastante positivos na maioria dos casos, desde que mantidas as condições de utilização/conservação recomendadas (agitação diária e conservação em refrigeração).

Constatou-se que no caso da formulação B, as amostras em estudo permaneciam com classificação 2, ou seja, foi identificada uma Ligeira alteração das características iniciais do produto (cor RAL 6010, 6017; cheiro pouco intenso; sem alterações perceptíveis), após vários dias de conservação em refrigeração (prazo inicialmente definido 24h), pelo que poderá ser possível avaliar a extensão do prazo atualmente recomendado. O que poderá significar um aumento de competitividade desta formulação, pois permitirá aos clientes uma melhor gestão dos stocks e adequação à utilização pretendida.

Em relação à formulação A, a validade secundária definida é de 30 dias de armazenamento em refrigeração (< 4°C), estando os resultados obtidos coerentes com o definido nas especificações, considerando-se que a mesma se encontra dentro das expectativas dos clientes.

Este relatório contribuiu para uma otimização do processo de design e desenvolvimento de novos produtos, em particular na determinação do tempo de prateleira dos produtos.

Como perspectiva futura e para a obtenção de resultados estatisticamente mais fiáveis, considera-se necessária continuar a recolha de dados, mesmo para os produtos, pois essa análise poderá permitir uma ampliação do tempo de prateleira, caso as características se mantenham inalteradas, pois a aquando do lançamento dos novos produtos, a atribuição de tempo de prateleira, geralmente é efetuado de um modo conservador, como salvaguarda da satisfação dos requisitos de clientes/mercados e na maioria das vezes não tendo sido possível a obtenção de resultados em estudos acelerados.

## 6. Referências bibliográficas

---

- Ahvenainen, R. (1996) New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*, (Volume 7, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10022-4](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10022-4)
- Albarracín, W., Sánchez, I. C., Grau, R., & Barat, J. M. (2011). Salt in food processing; usage and reduction: A review. In *International Journal of Food Science and Technology* (Volume 46, Issue 7, pp. 1329–1336). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02492.x>
- Al-Sammarraee, M., Chan, A., Salim, S. M., & Mahabaleswar, U. S. (2009). Large-eddy simulations of particle sedimentation in a longitudinal sedimentation basin of a water treatment plant. Part I: Particle settling performance. In *Chemical Engineering Journal*, (Volume 152, Issue 2–3, pp. 307–314). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.062>
- Badiola, M., Mendiola, D., & Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*, (Volume 51, Issue 26–35). <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.004>
- Bastos, R. G.; DE Albuquerque Bonini, M. (2017) Produção de biomassa de microalgas a partir de cultivo mixotrófico em acetato. *Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente*, (Volume 17, Issue 1, p. 38-44). <http://dx.doi.org/10.4322/2359-6643.04105>
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23–72). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Camacho, J.R., Cerón, M.C.G, Macías, M.D.S., et al. (2016) Long-term preservation of concentrated *Nannochloropsis gaditana* cultures for use in aquaculture. *J Appl Phycol* (Volume 28, pp. 299–312). <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0572-y>
- Campden, B. (2014) Setting product shelf life. <https://www.campdenbri.co.uk/news/setting-food-product-shelf-life.php>
- Carpenter, R., Lyon, D. and Hasdell, T. (2000) *Guidelines for Sensory Analysis in Food Product Development and Quality Control*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, (pp.71-91). <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4447-0>
- Castro, D. (2021). Development of a commercial microalgae enrichment for optimizing zebrafish reproduction. Tese de Mestrado em Aquacultura não editada, Universidade do Algarve, Faro, Portugal
- Clemmings, J.F., Notturmo, M.H., Occhino, L. and Porter, M., (2010) Not your mentor's shelf-life methods, Merlin development, Inc. Plymouth, MN, U.S.A., AACC International, Inc., (Volume 55, Issue 3), <https://doi:10.1094/CFW-55-3-0132>
- Conceição, L. E. C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010). Live feeds for early stages of fish rearing. In *Aquaculture Research* (Volume 41, Issue 5, pp. 613–640). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x>
- Costa I.F, (2022). Desenvolvimento e aplicação de um pipeline analítico a novas dietas formuladas com microalgas para aplicação em aquacultura. Tese de Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos não editada, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Peniche.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., & Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, (Volume 200, Issue 1–2, pp.129–146). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00697-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00697-4)
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013).

- Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.157>
- Diretiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de maio de 2002, relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais — Declaração do Conselho (JO L 140 de 30.5.2002, (pp. 10-22)
- Doucha, J. and Lívanský, k. (2011) Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters, *Journal of Applied Phycology* (Volume 24, Issue 1, pp. 35-43). <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9643-2>
- Durack, E., Alonso-Gomez, M., & Wilkinson, M. G. (2008). Salt: A Review of its Role in Food Science and Public Health. In *Current Nutrition & Food Science* (Volume 4). <https://doi.org/10.2174/157340108786263702>
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., & Sijtsma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. JRC Scientific and policy reports. <https://doi.org/10.2791/3339>
- Falaise, C., François, C., Travers, M. A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., & Mouget, J. L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. In *Marine Drugs* (Volume 14, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md14090159>
- Ferreira, M., Seixas, P., Coutinho, P., Fábregas, J., & Otero, A. (2011). Effect of the Nutritional Status of Semi-continuous Microalgal Cultures on the Productivity and Biochemical Composition of *Brachionus plicatilis*. *Marine Biotechnology*, (Volume 13, Issue 6, pp. 1074–1085). <https://doi.org/10.1007/s10126-011-9370-y>
- Food Safety Authority of Ireland (2022). Guidance Note N°18 – Validation of product shelf-life (Revision 5), Dublin, Ireland, disponível em <http://www.fsai.ie> (*searched on 22/08/2023*).
- Forberg, T., & Milligan-Myhre, K. (2017). Gnotobiotic Fish as Models to Study Host-Microbe Interactions. In *Gnotobiotics* (pp. 369–383). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804561-9.00006-2>
- Gimenez, A., Ares, F. e Ares, G. (2012). "Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches." *Food Research International* (Volume 49, Issue 1, pp.311-325). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.008>
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2019). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org/>; (*searched on 28/08/2023*)
- Kaparapu, J. (2018). Application of Microalgae in Aquaculture. *Phykos* (Volume 48, Issue 1, pp. 21–26). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/342096192>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. In *Microbial Cell Factories* (Volume 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kilcast, D. and Subramaniam, P. (2000) *The Stability and Shelf-Life of Food*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Boca Raton, Washington DC.
- Kogure, K., Simidu, U., & Taca, N. (1982). Bacterial attachment to phytoplankton in sea water. In *mar. Biol. Ecol* (Volume 56).
- Kostopoulou, V., Vasilakis, M. and Divanach, P. (2012), Semi-continuous mass culture of rotifers (*Brachionus plicatilis*) using an automatic feeder. *Aquaculture Research*, (Volume

- 43, pp. 91-98). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02807.x>
- Kotani, T., Haraguchi, T., Yamazaki, Y., Doi, T., Matsui, H., Yokoyama, S., ... Koshio, S. (2017). Effect of the duration of nutritional enrichment on the fatty acid composition of commonly used rotifers *Brachionus plicatilis* Complex and larviculture performance of red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture Science*, (Volume 65, Issue 2, pp.133–144). <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.65.133>
- Lubzens, E., & Sukenik, A. (1995). Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. In *Aquaculture* (Volume 133).
- Madeira, C., Lopes, M., Coelho, P., Afonso, D., Bandarra, C., Prates, N., (2017) Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review, *Livestock Science*, (Volume 205). <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.09.020>.
- Medipally, S., Yusoff, F., Banerjee, S., Shariff, M. (2015) Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production, *BioMed Research International*, (Volume 2015, Article ID 519513, pp. 13). <https://doi.org/10.1155/2015/519513>
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, (Volume 15, Issue 2, pp. 160–176). <https://doi.org/10.1002/elsc.201400191>
- Mishra, B., Tiwari, A. & Mahmoud, A.E.D. (2023) Microalgal potential for sustainable aquaculture applications: bioremediation, biocontrol, aquafeed. *Clean Techn Environ Policy* (Volume 25, pp. 675–687). <https://doi.org/10.1007/s10098-021-02254-1>
- Morizane, T. (1991). A Review of Automation and Mechanization Used In the Production of Rotifers in Japan. Rotifer and Microalgae culture systems. In *Proceedings of US–Asia Workshop*, Honolulu, HI. The Oceanic Institute (pp. 79–88).
- Nagappan, Senthil & Das, Probir & Abdulquadir, Mohammed & Thaher, Mahmoud & Khan, Shoyeb & Mahata, Chandan & Aljabri, Hareb & Vatland, Ann Kristin & Kumar, Gopalakrishnan. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*. (Volume 341). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.003>
- Nicoli, M. (2012). An Introduction to food shelf life: definitions, basic concepts, and regulatory aspects. *Em Shelf-Life Assessment of Food*. CRC Press, (volume 1, pp. 1-16). <https://doi.org/10.1201/b11871-2>
- Ou, Y., Li, R., & Liang, R. (2016). Experimental Study on the Impact of NaCl Concentration on the Flocculating Settling of Fine Sediment in Static Water. In *Procedia Engineering*, (Volume 154, pp. 529–535). <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.07.548>
- Ozkan, A., & Berberoglu, H. (2013). Physico-chemical surface properties of microalgae. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (Volume 112, pp. 287–293). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.001>
- Piasecka, A., Krzemińska, I., & Tys, J. (2014). Physical methods of microalgal biomass pretreatment. *International Agrophysics*, (Volume 28, Issue 3, pp. 341–348). <https://doi.org/10.2478/intag-2014-0024>
- Regulamento da Comissão Europeia (UE) No 68/2013 - Relativo ao Catálogo de matérias-primas para alimentação animal
- Richmond, A. (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (Blackwell). Blackwell Publishing Company, Iowa.
- Robertson, G. L. (2010). *Food Packaging and Shelf Life: A Practical Guide*. Boca Raton, FL:

- CRC Press/Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00669.x>
- Roik, A., Röthig, T., Roder, C., Ziegler, M., Kremb, S. G., & Voolstra, C. R. (2016). Year-long monitoring of physico-chemical and biological variables provide a comparative baseline of coral reef functioning in the central Red Sea. In PLoS ONE, (Volume 11, Issue 11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163939>
- Royo-Cebreros, A. H., Ibarra-Castro, L., Guerrero-Carlock, E., Sánchez-Téllez, J. L., & Alvarez-Lajonchère, L. (2017). Pilot-scale production of the rotifer *Brachionus* sp. under different culture systems. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, (Volume 52, Issue 3, pp. 539–549). <https://doi.org/10.4067/s0718-19572017000300011>
- Roy, S. Sen, & Pal, R. (2015). Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, (Volume 68, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s12595-013-0089-9>
- Sales, R., Derner, R. B., & Tsuzuki, M. Y. (2019). Effects of different harvesting and processing methods on *Nannochloropsis oculata* concentrates and their application on rotifer *Brachionus* sp. cultures. In *Journal of Applied Phycology*, (Volume 31, Issue 6, pp. 3607–3615). <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01877-8>
- Schluter, M., & Groeneweg, J. (1985). The inhibition by ammonia of population growth of the rotifer, *Brachionus Rubens*, in continuous culture. In *Aquaculture* (Volume 46). Elsevier Science Publishers B.V.
- Skjermo, J. & Vadstein, O. (1993) Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, (pp. 255–256). <https://doi.org/10.1007/BF00025838>
- Tidwell, J. H. (2012). *Aquaculture Production Systems*. Aquaculture Production Systems. <https://doi.org/10.1002/9781118250105>
- Trovão, M., Pereira, H., Silva, J., Páramo, J., Quelhas, P., Santos, T., Silva, J. T., Machado, A., Gouveia, L., Barreira, L., & Varela, J. (2019). Growth performance, biochemical composition and sedimentation velocity of *Tetraselmis* sp. CTP4 under different salinities using low-cost lab- and pilot-scale systems. In *Heliyon*, (Volume 5, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01553>
- Vadstein, O., Øie, G., & Olsen, Y. (1993). Particle size dependent feeding by the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, (pp. 255–256). <https://doi.org/10.1007/BF00025847>
- Valero, A.; Carrasco, E.; García-Gimeno, R. (2012). Principles and Methodologies for the Determination of Shelf–Life in Foods. *Em Trends in Vital Food and Control Engineering*. InTech, (Volume 1, pp. 3-42). <https://doi.org/10.5772/35353>
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Ángeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M. A. O., & Faggio, C. (2020). Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, (Volume 28, Issue 1, pp. 16–42). <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1643288>
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (Volume 64, Issue 4, pp. 655–671). Retrieved from <http://www.who.int/inf-fs/en/fact194.html>
- Verspreet, J., Krepes, S., & Bastiaens, L. (2020). Evaluation of Microbial Load, Formation of Odorous Metabolites and Lipid Stability during Wet Preservation of *Nannochloropsis gaditana* Concentrates. *Applied Sciences*, (Volume 10, Issue 10, pp. 3419). MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/app10103419>
- Zhang, H., Gong, T., Li, J., Pan, B., Hu, Q., Duan, M., & Zhang, X. (2022). Study on the Effect

of Spray Drying Process on the Quality of Microalgal Biomass: a Comprehensive Biocomposition Analysis of Spray-Dried *S. acuminatus* Biomass. *Bioenergy Research*, (Volume 15, Issue 1, pp. 320–333). <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10343-8>