



**Alícia Rodrigues
Antunes**

**Degradação do perfil bioquímico de um
concentrado de *Nannochloropsis sp.*
durante o seu período de validade**



**Alícia Rodrigues
Antunes**

**Degradação do perfil bioquímico de um
concentrado de *Nannochloropsis sp.*
durante o seu período de validade**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Maria Teresa Lamela Pérez, Coordenadora do Departamento de Qualidade da Necton S.A.

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE), à Unidade de investigação QOPNA (projecto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296)



Dedico este trabalho a todos que me deram apoio incondicional

o júri

Presidente

Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes

Investigadora Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues

Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (orientadora)

agradecimentos

Quero aproveitar este espaço para agradecer a todas as pessoas que contribuíram para tornar este trabalho possível.

Às minhas orientadoras, Doutora Rosário Domingues e Doutora Teresa Lamela, quero agradecer o conhecimento transmitido, a disponibilidade, ajuda e paciência que demonstraram ao longo deste trabalho.

À família da Necton, em particular a das microalgas, quero agradecer a hospitalidade, o carinho e a boa disposição. Foi para mim um prazer poder trabalhar com vocês.

Ao grupo de espectrometria de massa quero agradecer a hospitalidade e apoio demonstrados. Agradecimentos especiais são devidos à Doutora Cristina Barros, pela boa disposição e pelos conselhos transmitidos, bem como à Beta, Ana, Tânia, Eliana e Elisabete. Obrigada pela constante ajuda, disponibilidade e apoio.

Às minhas orientadoras não oficiais, Hélia e Catarina, obrigada por tudo. Entre conhecimento e gargalhadas, vocês providenciaram ambos e conseguiram tornar Faro a minha segunda casa. À Doutora Vitória eu agradeço o apoio e a confiança em mim depositada.

Às minhas companheiras de bancada, eu agradeço a camaradagem, a amizade e o carinho. À Bruna, obrigada pelas gargalhadas e pela amizade. À Bebian, Sofia, Guida, Diana e Ana Sofia, foi um prazer trabalhar ao vosso lado. Se ultrapassei algumas dificuldades com um sorriso no rosto, a vocês o devo.

Aos meus amigos eu quero agradecer a sua presença na minha vida. Ao António eu agradeço a paciência e disponibilidade. Não deve ter sido fácil ouvir constantemente os meus desabafos, mas fizeste-o sem nunca te recusares a ouvires-me. Só espero ter de alguma forma retribuído o gesto. À Vânia e ao Rafael, nem sei por onde começar a agradecer. Vocês são essenciais para mim e isso tornou-se evidente neste último ano. Mesmo a 500 km de distância, vocês estiveram sempre perto, para ouvir, para falar, ou para simplesmente estar presente. A amizade não é sobre os que nos conhecem há mais tempo, mas sim sobre aqueles que chegam à nossa vida e nunca saem do nosso lado, pelo que eu só posso ter gratidão e orgulho em chamar-vos meus amigos.

Por último, quero agradecer aos meus pais. Este agradecimento não chega para demonstrar a profunda gratidão que vos tenho, pois se sou quem sou hoje, a vocês o devo. Tenho 22 anos de memórias, momentos, família, felicidade, carinho e amor, porque vocês fazem parte de todos eles.

palavras-chave

Microalgas, perfil bioquímico, *Nannochloropsis sp.*, aquacultura, concentrados de microalgas, métodos de conservação, tempo de prateleira

resumo

As algas do género *Nannochloropsis* são microalgas marinhas que apresentam um perfil bioquímico único, principalmente no que é respeitante a lípidos, e uma vasta gama de compostos bioativos que possibilitam a sua aplicabilidade comercial em várias áreas biotecnológicas, destacando-se a alimentação e nutrição humana, indústria cosmética e farmacêutica, produção de biocombustíveis e a sua utilização em aquacultura.

Em aquacultura, são usadas maioritariamente microalgas vivas, cuja produção representa elevados custos. Tem havido assim uma pesquisa de dietas alternativas, entre as quais os concentrados de microalgas se apresentam promissores. Os desafios atuais das empresas produtoras de concentrados de microalgas prendem-se com a conservação e armazenamento destes concentrados.

Assim, neste trabalho foi proposto o estudo da influência da refrigeração, congelação e adição de conservantes a PhytoBloom Green Formula®, concentrado de *Nannochloropsis sp.* comercializado pela empresa Necton S.A., com o objetivo de averiguar a variação de parâmetros bioquímicos e organoléticos com a exposição do concentrado aos diferentes métodos de conservação. Pretendia-se assim observar se estes processos podem ser usados para aumentar o tempo de prateleira do concentrado em estudo. Para tal, foram avaliadas amostras recolhidas em três pontos temporais e analisados os seguintes parâmetros: perfil de ácidos gordos, quantificação de hidroperóxidos lipídicos, quantificação espectrofotométrica de clorofila a e carotenóides, bem como parâmetros organoléticos.

Inicialmente, foi efetuada uma avaliação de diferentes parâmetros organoléticos, não se observando variações relevantes entre amostras das diferentes condições. Assim, foi posteriormente realizada a avaliação bioquímica. Primeiramente, foi efetuada a quantificação de ácidos gordos por GC-FID das diferentes amostras, nas quais não se observou diferenças significativas entre as condições experimentais. Foi também efetuada um ensaio de FOX II, que permitiu avaliar o grau de peroxidação lipídica de cada amostra por quantificação de hidroperóxidos lipídicos formados. As amostras nas quais houve adição de conservantes apresentaram um teor menor de hidropéroxidos lipídicos, permitindo inferir que a ação dos conservantes com propriedades antioxidantes permitiu uma melhor conservação da amostra. Quando se determinou a concentração de clorofila a e de carotenóides verificou-se que, em ambos os casos, a congelação conduziu a uma estabilização da concentração destes pigmentos. No entanto, os melhores resultados foram obtidos usando a combinação de congelação com adição de conservantes.

Estes resultados, embora promissores, carecem de uma confirmação por um novo estudo, completando com análises com maior rigor e sensibilidade associados, no sentido de se verificar qual o método mais vantajoso para a extensão do tempo de prateleira de PhytoBloom Green Formula®.

keywords

Microalgae, biochemical composition, *Nannochloropsis* sp., aquaculture, microalgae concentrates, preservation techniques, shelf-life

abstract

Nannochloropsis are marine microalgae that have an unique biochemical profile, especially lipids, and a wide range of bioactive compounds that enable its commercial applicability to various biotechnological areas, such as human nutrition, cosmetic and pharmaceutical industry, biofuel production and their use in aquaculture.

In aquaculture, live microalgae are commonly used, but their production is costly. Thus, there has been a search for alternative diets and microalgae concentrates are looking promising. The current challenges of companies that make microalgae concentrates are related with the preservation and storage of these concentrates.

Therefore, in this study was evaluated the influence of refrigeration, freezing and addition of chemical preservatives to PhytoBloom Green Formula®, *Nannochloropsis* sp. concentrate marketed by Necton SA. The goal of this study was to investigate the variation of biochemical and organoleptic parameters of the microalgae concentrate exposed to the different methods of preservation, and thus to observe if these can be used to increase the shelf-life of the concentrate studied. To this end, different organoleptic and biochemical parameters were evaluated in collected samples at three time points, including fatty acid profile, lipid hydroperoxides measurement, spectrophotometric determination of chlorophyll a and carotenoids, as well as organoleptic parameters.

Initially, an organoleptic analysis was performed, and no significant differences were noticed between the different experimental conditions. Therefore, various biochemical parameters were evaluated next. First, a fatty acids measurement of the different samples was performed using GC-FID and no significant differences between the experimental conditions were observed. Then, a FOX-2 method was done, evaluating lipid peroxidation in each sample by determining the concentration of lipid peroxides. The samples where food preservatives were added had a lower content of lipid hydroperoxides, meaning that the action of preservatives with antioxidant properties was effective. When the spectrophotometric measurements of the pigments were performed, it was noticed that in both cases (chlorophyll a and carotenoids), the content of the pigment remained stable on the three time points. Nonetheless, the best results were obtained when freezing and preservatives were combined.

These results, although promising, require a new study for confirmation and additional analysis with more accuracy and precision in order to establish which preservation method is more suitable for extending PhytoBloom Green Formula's shelf-life.

Índice

Índice.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas	v
Abreviaturas.....	vii
1. Introdução	1
1.1. Microalgas	3
1.1.1. <i>Nannochloropsis</i>	3
1.1.2. Perfil bioquímico.....	4
1.1.2.1. Proteínas.....	4
1.1.2.2. Hidratos de carbono.....	5
1.1.2.3. Lípidos	6
1.1.2.4. Pigmentos	8
1.2. Aplicações de microalgas	9
1.2.1. Utilização de microalgas na alimentação humana.....	9
1.2.2. Utilização de microalgas na produção de biodiesel	10
1.2.3. Utilização de microalgas como fonte nutricional em aquacultura	10
1.3. Produção e Conservação de microalgas para aquacultura	15
1.3.1. Reações químicas de degradação de microalgas.....	17
1.3.2. Reações enzimáticas de degradação de microalgas	18
1.3.3. Fatores que influenciam a degradação de microalgas.....	18
1.3.4. Métodos de conservação de microalgas	20
1.3.4.1. Métodos de conservação físicos	20
1.3.4.2. Métodos de conservação químicos	21
2. Objetivos.....	23
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Preparação de PhytoBloom Green Formula®.....	29
3.2. Preparação da solução de conservantes	29
3.3. Preparação das amostras a avaliar	30
3.4. Avaliação organolética	30
3.4.1. Determinação de cor e cheiro	30
3.4.2. Determinação da capacidade de ressuspensão.....	30
3.4.3. Medição do pH.....	31
3.5. Amostragem.....	31

3.5.1.	Reagentes	33
3.5.2.	Extração de lípidos	33
3.5.3.	Quantificação de ácidos gordos por GC-FID.....	34
3.5.4.	Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II.....	36
3.5.5.	Quantificação de pigmentos por espectrofotometria: quantificação de clorofila a e de carotenóides	37
3.5.6.	Análise estatística.....	38
4.	Resultados e Discussão	39
4.1.	Avaliação organolética	41
4.2.	Quantificação de ácidos gordos por GC-FID.....	43
4.3.	Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II	49
4.4.	Quantificação de pigmentos por espectrofotometria: quantificação de clorofila a e carotenóides.....	55
5.	Conclusões e Diretrizes Futuras	65
6.	Bibliografia.....	71

Índice de Figuras

Figura 1. Aplicações alimentares e nutricionais das microalgas no contexto de aquacultura.....	14
Figura 2. Representação de métodos usados na produção em massa de microalgas: “Open ponds” (à esquerda) e Fotobiorreator (PBR) Tubular (à direita).	16
Figura 3. Esquema da recolha das alíquotas correspondentes a três pontos temporais (T1, T2 e T3).	32
Figura 4. Avaliação da cor das amostras de PhytoBloom green formula®, segundo o Sistema RAL, em três pontos temporais (T1, T2 e T3).	43
Figura 5. Abundância de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula®.	47
Figura 6. Distribuição das classes de ácidos gordos nas amostras de PhytoBloom Green Formula® sem e com conservantes, sujeitas a refrigeração e congelação, nos três pontos temporais (T1, T2 e T3).	48
Figura 7. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C).....	50
Figura 8. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sujeito a congelação (-18°C).	52
Figura 9. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C)..	53
Figura 10. Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C). ..	57
Figura 11. Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sujeito a congelação (-18°C).. ..	58
Figura 12. Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).	59
Figura 13. Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C).....	60
Figura 14. Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sujeito a congelação (-18°C).. ..	61
.....	
Figura 15. Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).	62

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação taxonómica da microalga do género <i>Nannochloropsis</i>	4
Tabela 2. Evolução da produção mundial de "food fish" em aquacultura terrestre e maricultura por continente.....	11
Tabela 3. Exemplos de algumas empresas, a nível mundial, especializadas na produção de concentrados de microalgas para uso em aquacultura.	16
Tabela 5. Designação dos três pontos temporais, recolha, análise e condições respetivas.	33
Tabela 6. Avaliação de cor, cheiro, pH e capacidade de ressuspensão de PhytoBloom Green Formula®, sem e com conservantes sujeito a refrigeração ou congelação.....	41
Tabela 7. Abundância relativa de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula®, sem e com conservantes sujeito a refrigeração ou congelação.	45

Abreviaturas

ALA	Ácido α -Linolénico, <i>do inglês alpha-Linolenic Acid</i>
ARA	Ácido Araquidónico, <i>do inglês Arachidonic Acid</i>
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
DAG	Diacilglicerídeos
DGDG	Digalactosildiácilglicerol
DGTS	Diacilgliceriltrimetilhomo-serina
DHA	Ácido Docosahexanóico, <i>do inglês Docosahexanoic Acid</i>
EPA	Ácido Eicosapentanóico, <i>do inglês Eicosapentanoic Acid</i>
FAME	Ácidos gordos metil-esterificados, <i>do inglês Fatty Acids Methyl Esters</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOX	<i>Ferric - Xylenol Orange</i>
GC-FID	Cromatografia Gasosa acoplada a Detetor de Ionização por Chama, <i>do inglês Gas Chromatography - Flame Ionization Detector</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrómetro de Massa, <i>do inglês Gas Chromatography - Mass Spectrometer</i>
GLA	Ácido γ -Linolénico, <i>do inglês gamma-Linolenic Acid</i>
IUPAC	União Internacional de Química Aplicada, <i>do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MAG	Monoácilglicerídeos

MGDG	Monogalactosildiácilglicerol
MS	Espetrometria de massa, <i>do inglês Mass Spectrometry</i>
MUFA	Ácidos Gordos Mono-insaturados, <i>do inglês Mono-unsaturated Fatty Acids</i>
PBgf	PhytoBloom Green Formula®
PBR	Fotobiorreatores, <i>do inglês Photobioreactors</i>
PPO	Polifenol Oxidase, <i>do inglês Poliphenol Oxidase</i>
PUFA	Ácidos Gordos Poli-insaturados, <i>do inglês Poli-unsaturated Fatty Acids</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio, <i>do inglês Reactive Oxygen Species</i>
SAFA	Ácidos Gordos Saturados, <i>do inglês Saturated Fatty Acids</i>
SCP	Proteína de Célula Única, <i>do inglês Single Cell Protein</i>
TAG	Triácilglicerídeos
TLC	Cromatografia de camada fina, <i>do inglês Thin-layer Chromatography</i>

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Microalgas

No geral, o termo "algas" engloba organismos fotossintéticos, de natureza eucariota ou procariota, excluindo plantas superiores (1). Alguns dos grupos mais significativos de algas incluem as algas verdes (Chlorophyceae), algas vermelhas (Rhodophyceae), diatomáceas (Bacillariophyceae) e algas castanhas (Phaeodophyceae). As algas estão divididas em duas categorias principais: macro e microalgas. As macroalgas são organismos multicelulares com características estruturais similares às das plantas superiores e o seu tamanho pode exceder vários metros (1). As microalgas são um grupo diverso de microorganismos, cujo tamanho se situa entre os 2 e os 100µm, que se autorreproduzem usando a fotossíntese para converter a energia solar em energia química, completando um ciclo de crescimento em poucos dias (2). Elas podem crescer numa grande variedade de habitats, quer aquáticos quer terrestres, e sob condições extremas (alterações de salinidade, temperatura, nutrientes, intensidades de luz sub e supraótimas, entre outras). Fruto da necessidade de adaptação rápida às novas condições ambientais para sobreviverem, as microalgas possuem diferentes estratégias fisiológicas, bioquímicas e moleculares, produzindo uma vasta gama de metabolitos secundários biologicamente ativos, que não são encontrados noutros organismos. Como tal, a composição geral do fitoplâncton pode ser um fator determinante na escolha das espécies de microalgas como fontes de alimento (3).

Por ser o objeto de estudo deste trabalho, irá ser descrito em maior detalhe o género *Nannochloropsis*.

1.1.1. *Nannochloropsis*

O género *Nannochloropsis* foi criado em 1986, fruto de estudos a nível ultra-estrutural que o diferenciaram do género *Chlorella*. O género *Nannochloropsis* está integrado na classe Eustigmatophyceae (4) (Tabela 1) e existem seis espécies reconhecidas como pertencentes a este género.

Tabela 1. Classificação taxonómica da microalga do género *Nannochloropsis* [Adaptado de Correia 2013 (5)].

Classe Taxonómica	<i>Nannochloropsis sp.</i>
Filo	Ochrophyta
Classe	Eustigmatophyceae
Ordem	Eustigmatales
Família	Monodopsidaceae
Género	<i>Nannochloropsis</i>

As algas do género *Nannochloropsis* são microalgas marinhas de pequenas dimensões, entre 2 a 5µm, de forma esférica ou ligeiramente ovalada, cor verde/castanha e não flageladas (6). *Nannochloropsis* tem um perfil nutricional único, devido principalmente ao seu elevado teor lipídico. Existem ainda outras características deste género, para além do seu perfil bioquímico, que tornam estas microalgas ideias para uso em aquacultura, das quais se evidenciam a taxa de crescimento relativamente elevada, o metabolismo muito ativo e a resistência às contaminações (7).

1.1.2. Perfil bioquímico

A composição bioquímica, não só das algas do género *Nannochloropsis*, mas das microalgas no geral, não é rígida, dado que modificações no meio de cultura, ou mesmo a manipulação das condições de cultivo podem conduzir a alterações quantitativas e qualitativas de proteínas, lípidos, hidratos de carbono e pigmentos, fundamentalmente (8).

1.1.2.1. Proteínas

O teor proteico das microalgas é um fator determinante na avaliação do seu valor nutricional, através do conteúdo, disponibilidade e proporção de aminoácidos. Em condições de cultivo ótimas, o perfil de aminoácidos é normalmente constituído maioritariamente por aspartato e glutamato, sendo que podem existir, em menores concentrações, cisteína, metionina, triptofano e histidina (9). Na fase exponencial de crescimento das microalgas, considera-se que o seu teor proteico varia entre 30 e 40% (10); no entanto, esta percentagem não é fixa, podendo ser alterada com a variação das

condições de cultivo das microalgas. De facto, Renaud *et al* (11) determinaram que o teor total de proteína, em várias espécies de microalgas, diminuía com o aumento progressivo da temperatura, afirmando que o aumento da temperatura poderia levar à decomposição estrutural das proteínas. Outro fator que parece influenciar o teor proteico das microalgas é a intensidade de luz. Fábregas e seus colaboradores (12) observaram um aumento de aproximadamente 30% no que toca ao conteúdo proteico quando a intensidade de luz que incidia na cultura de microalgas aumentou de 40 para 80 μmol quanta m^2/s , sendo as causas deste fenómeno não completamente elucidadas.

No que é respeitante aos concentrados em particular, as condições de armazenamento podem exercer algum efeito no teor proteico total, bem como no perfil de aminoácidos que as microalgas apresentam. De facto, num estudo efetuado por Welladsen e seus colaboradores (13), observou-se um aumento do teor de proteína total num concentrado de *Nannochloropsis sp.* após dois meses de congelação. Foi também observado um aumento, na ordem dos 6%, da concentração de aminoácidos essenciais, especialmente histidina, metionina, fenilalanina e valina.

Desde o início dos anos 50 que tem sido feito um esforço para explorar fontes de proteína alternativas, primariamente em antecipação a um fornecimento insuficiente de proteínas no futuro por parte das fontes convencionais, tais como carne e peixe. Para tal, leveduras, fungos, bactérias e microalgas, por exemplo, têm sido apelidadas de *Single Cell Protein* (SCP), descrevendo a produção de proteínas a partir de biomassa de origem microbiológica. Está também comprovado que a qualidade das proteínas encontradas em microalgas é por vezes, superior à encontrada em plantas terrestres (1).

1.1.2.2. Hidratos de carbono

Nas microalgas, o teor em hidratos de carbono é variável, de acordo com a espécie e a fase de crescimento. Os hidratos de carbono são compostos formados na fase escura da fotossíntese, a partir do ciclo de Calvin, sendo considerados os produtos maioritários deste conjunto de reações (14).

Os hidratos de carbono presentes nas microalgas incluem monossacarídeos como a glucose, ramnose, xilose e manose, mas são maioritariamente constituídos por polissacarídeos. Estes podem desempenhar funções estruturais, constituindo a parede celular, como é o caso da celulose, ou funções de reserva. Os polissacarídeos de reserva

variam consoante a espécie de microalga (15) geralmente acumulados sob a forma de amido nos plastídeos. A função de reserva e armazenamento é de vital importância, já que fornece parte da energia requerida para o funcionamento normal do metabolismo e, em situações adversas, permitem o reajuste do perfil bioquímico às novas condições, o que conduz à sobrevivência do organismo (14).

Os hidratos de carbono de *Nannochloropsis sp.* podem atingir entre 5 e 33% da biomassa seca algal; no entanto, este intervalo de percentagens não é rígido, podendo ser alterado com as condições do meio (10), como a limitação de azoto no meio de cultivo (16), temperatura elevada (11) ou mesmo variações na intensidade de luz (12). A manipulação das condições de cultivo é uma estratégia atualmente adotada para manipular o teor em hidratos de carbono das microalgas.

1.1.2.3. Lípidos

Os lípidos podem atingir até cerca de 70% da biomassa seca das microalgas, apesar de, normalmente, o seu teor variar entre os 10 e os 20%. As microalgas, bem como os restantes organismos vegetais, são os únicos que conseguem sintetizar, de raiz, os ácidos gordos ómega 3 e ómega 6, essenciais aos organismos heterotróficos, ocupando por isso uma posição de destaque na cadeia trófica (1). As microalgas contêm, maioritariamente, lípidos estruturais polares, como fosfolípidos e glicolípidos, e lípidos de armazenamento neutros, como os mono- (MAG), di- (DAG) e triacilglicerídeos (TAG). Os lípidos estruturais polares estão confinados a membranas de organelos, como as membranas tilacoidais. Os lípidos de armazenamento, mormente os TAG, encontram-se armazenados no vacúolo intracelular (10). Existem ainda alguns glicolípidos associados à função fotossintética das microalgas. Os glicolípidos maioritários são monogalactosildiacylglicerol (MGDG), digalactosildiacylglicerol (DGDG) e diacylgliceriltrimetilhomo-serina (DGTS). Sob condições limitantes de fosfatos no meio, uma das estratégias adaptativas das microalgas é a substituição de fosfolípidos membranares por glicolípidos que não contenham fosfato na sua constituição (17). MGDG e DGDG são glicolípidos presentes nas membranas tilacoidais que podem atuar como marcadores do fim da fase estacionária de microalgas; no entanto, as suas funções principais prendem-se com a manutenção da estabilidade membranar e da atividade funcional das proteínas membranares (17,18).

Há muito que é sabido que as microalgas, especialmente as pertencentes ao género *Nannochloropsis*, têm um elevado teor lipídico. São consideradas uma fonte importante de PUFA ómega 3 (19), largamente usada em aquacultura. Os PUFA ómega 3, nomeadamente os ácidos eicosapentanóico (C20:5) (EPA) e docosahexanóico (C22:6) (DHA) são componentes estruturais essenciais das membranas celulares (1,14) e possuem algumas propriedades benéficas, como por exemplo o DHA tem um papel crucial no desenvolvimento das células do sistema ocular e do sistema neuronal dos peixes (13). Os ácidos araquidónico (C20:4) (ARA) e docosahexanóico (DHA) estão envolvidos na produção de eicosanóides, que desempenham um papel importante na sinalização e regulação da resposta imunológica, osmorregulação, biossíntese de esteróides, entre outros (20). Estas propriedades associadas ao facto dos animais marinhos serem incapazes de sintetizar PUFA de cadeia longa, dos quais o ácido eicosapentanóico (EPA) e o ácido araquidónico (ARA) são exemplos, torna as microalgas praticamente imprescindíveis para um crescimento e desenvolvimento saudáveis das larvas de peixe (1,21,22).

A composição do meio onde as microalgas são cultivadas é um fator decisivo no perfil de ácidos gordos que as microalgas apresentam, quer qualitativa, quer quantitativamente, sendo frequentemente usado como parâmetro de manipulação do perfil bioquímico das microalgas. De facto, vários estudos verificaram que a depleção de azoto no meio de cultivo conduzia a uma modificação do perfil de ácidos gordos de *Nannochloropsis sp.*, com um aumento de ácidos gordos saturados (SFA), sobretudo os ácidos hexadecanóico (C16:0) e octadecanóico (C18:0), e uma diminuição significativa de ácidos gordos poli-insaturados (PUFA) (19,23,24).

As condições climatéricas podem também influenciar o perfil de ácidos gordos que as microalgas apresentam, podendo assim influenciar o rendimento lipídico e a qualidade da biomassa algal, fatores importantes no contexto de aquacultura (7,19,24). De facto, Olofsson e seus colaboradores verificaram que, na mesma área geográfica, as estações do ano e as variações climatéricas que as acompanham traduziam-se em alterações significativas na percentagem de ácidos gordos saturados (SFA), mono-insaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) de *Nannochloropsis sp.* cultivadas em fotobiorreatores (PBR). Durante os meses de Verão, verificava-se a predominância de PUFA, contrastando com os resultados durante os meses de Inverno, nos quais a distribuição dos ácidos gordos pelas diferentes classes era equitativa (7).

1.1.2.4. Pigmentos

Outra classe de compostos químicos com alguma relevância nas microalgas são os pigmentos. Os pigmentos são também compostos de natureza lipídica, dada a sua insolubilidade em água. Os pigmentos são responsáveis por conferir cor às células, sendo que as classes e proporções de pigmentos são muitas vezes características de cada gênero, e por vezes de cada espécie, das microalgas em questão. A composição em pigmentos das algas do gênero *Nannochloropsis* é caracterizada por clorofila a (e não clorofila b nem clorofila c) e carotenóides como o β -caroteno, violaxantina e vaucherixantina como pigmentos majoritários. Estas algas também contêm pequenas quantidades de outros carotenóides, como a cantaxantina e a astaxantina. Os carotenóides são pigmentos castanhos presentes em elevadas quantidades em microalgas, cujas funções incluem a estabilização dos complexos fotossintéticos e a proteção contra o *stress* oxidativo, devido às suas propriedades antioxidantes. No contexto de aquacultura, os carotenóides têm um papel importante na coloração de diferentes animais marinhos, como os crustáceos ou o salmão (1,25).

Os carotenóides são moléculas relativamente instáveis e a sua degradação, essencialmente oxidativa, pode ser despoletada pela luz, temperatura, entre outros. Gouveia e seus colaboradores (26) estudaram a influência da temperatura e da luz no conteúdo de carotenóides totais de *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis*, observado que havia maior perda de carotenóides nas amostras expostas à luz, comparando com as que foram mantidas no escuro, bem como uma maior degradação de carotenóides em amostras expostas à temperatura ambiente, quando comparadas com amostras congeladas.

O teor dos pigmentos é influenciado por fatores como a depleção de azoto ou disponibilidade limitada de nutrientes. Num estudo realizado por Greene e seus colaboradores (27) sobre a influência da limitação de nutrientes, nomeadamente ferro, na fotossíntese em *Phaeodactylum tricornutum*, uma diatomácea castanha, observou-se que, para além duma diminuição da eficiência dos fotossistemas, em particular o fotossistema II, a diminuição da disponibilidade de ferro no meio onde a alga foi cultivada conduzia a uma diminuição na concentração de clorofila a. Sauer e seus colaboradores (28) observaram um fenómeno semelhante ao verificado por Greene e seus colaboradores: uma

depleção prolongada de azoto induzia em amostras de uma estirpe de *Synechococcus* o fenómeno de clorose - diminuição da produção de clorofila.

1.2. Aplicações de microalgas

Recentemente, tem existido um interesse crescente nas microalgas, devido essencialmente à sua capacidade de adaptação a diferentes habitats, e consequente riqueza de metabolitos secundários, bem como à facilidade de manipulação do seu perfil bioquímico, consoante os requisitos necessários comercial e industrialmente. As microalgas servem de matéria-prima bruta num grande número de áreas biotecnológicas, como a nutrição e alimentação, as indústrias cosmética e farmacêutica, a produção de biocombustíveis, entre outras, que serão descritas seguidamente, acrescentando ainda o seu potencial na área da biorremediação e tratamento de águas residuais.

1.2.1. Utilização de microalgas na alimentação humana

As microalgas são uma fonte importante de compostos bioquímicos de elevado valor, daí que atualmente existam várias aplicações comerciais das microalgas, entre as quais se destacam o seu uso em suplementos alimentares, para aumentar o valor nutricional de alimentos (29). De facto, as microalgas marinhas têm uma grande quantidade de lípidos bioativos com elevada percentagem de ácidos gordos poli-insaturados (PUFA) (19). Os PUFA, especialmente, os ácidos eicosapentanóico e docosahexanóico têm demonstrado alguns efeitos benéficos, nomeadamente efeito protetor na aterosclerose, doenças cardiovasculares e um efeito positivo na redução dos níveis plasmáticos de colesterol e triacilgliceróis (30).

Outra classe de compostos com alguma relevância no contexto da alimentação humana são os pigmentos. Os pigmentos das microalgas, como os carotenóides, podem ser usados como corantes alimentares, nomeadamente em bebidas como o sumo de laranja, ou na pigmentação da gema de ovo. No entanto, os carotenóides têm ainda uma importância terapêutica devido à sua capacidade de atuar como pró-vitamina A, isto é, eles podem ser convertidos em vitamina A, importante para a saúde humana pelas suas propriedades anti-inflamatórias intrínsecas (26).

1.2.2. Utilização de microalgas na produção de biodiesel

A escassez de combustíveis fósseis, e o conseqüente aumento do seu preço, e as exigências cada vez maiores de redução das emissões de dióxido de carbono conduziram a uma pesquisa extensiva no que diz respeito a fontes de combustíveis renováveis. As microalgas, como organismos produtores de elevadas quantidades de lípidos, constituem uma potencial matéria-prima para a produção de biocombustíveis e apresentam algumas vantagens face às fontes convencionais de biodiesel (7):

- Elevadas taxas de produção lipídica, quando comparadas com plantas terrestres, culturas agrícolas, ou outras plantas aquáticas;
- Possibilidade de serem cultivadas em terrenos não aráveis, não competindo por terrenos aráveis com as espécies convencionais de agricultura;
- Utilização de água salgada ou residual no seu cultivo, reduzindo assim o gasto de água doce;
- Capacidade de crescerem em condições agrestes e necessidades baixas de nutrientes;
- Possibilidade de modulação da composição bioquímica das microalgas por variação das condições de cultivo, resultando num maior teor lipídico.

Sem descurar as mais-valias resultantes das diferentes aplicações das microalgas em contexto empresarial, considera-se que, até à data, uma das vertentes comerciais com maior rentabilidade é a sua utilização em aquacultura.

1.2.3. Utilização de microalgas como fonte nutricional em aquacultura

Tem-se verificado um crescente consumo de peixe a nível mundial, aumento este que acarreta algumas desvantagens, entre as quais o facto da sobre-exploração e pesca de populações selvagens estarem a atingir níveis críticos (1), tornando-se crucial uma gestão dos recursos pesqueiros que permita o equilíbrio entre as necessidades alimentares e a captura de recursos, de modo a que as populações capturadas não atinjam níveis demasiado perigosos (31).

A contribuição da aquicultura para a nutrição humana está a aumentar exponencialmente, dado permitir um consumo regular de peixe sem comprometer as populações selvagens que são alvo de captura. De acordo com as estatísticas publicadas pela FAO (32), a produção mundial de aquicultura em 2012 foi de 90,43 milhões de toneladas, das quais 66,63 milhões de toneladas correspondem a "*food fish*" (Tabela 2), termo que inclui pescado, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos produzidos com o intuito de serem usados para consumo humano.

Tabela 2. Evolução da produção mundial de "*food fish*" em aquicultura terrestre e maricultura por continente [Adaptado de FAO 2014 (32)].

	Aquicultura	1990	1995	2000	2005	2010	2012
África	Aquicultura terrestre	77.279	102.703	391.581	632.001	1.273.503	1.467.749
	Maricultura	3.736	7.589	8.107	14.181	13.088	17.618
	Total	81.015	110.292	399.688	646.182	1.286.591	1.485.367
América	Aquicultura terrestre	300536	398112	609909	748545	977923	1177439
	Maricultura	247.943	521.459	813.524	1.428.195	1.603.166	2.009.881
	Total	548.479	919.571	1.423.433	2.176.740	2.581.089	3.187.319
Ásia	Aquicultura terrestre	6.574.192	12.650.165	17.321.975	242.78.467	34065242	38.835.173
	Maricultura	4.227.464	9.027.349	11.100.514	14.909.386	18.374.989	20.064.895
	Total	10.801.656	21.677.514	28.422.489	39.187.853	53.440.140	58.900.068
Europa	Aquicultura terrestre	711.254	445.512	454.849	460.048	466.615	461.095
	Maricultura	890.279	1.135.395	1.595.840	1.674.856	2.077.363	2.415.213
	Total	1.601.524	1.580.907	2.050.689	2.134.904	2.543.978	2.876.309
Oceânia	Aquicultura terrestre	1.781	2.692	3.808	1.800	3.660	4.309
	Maricultura	40.224	91.546	117.674	149.666	181.957	179.882
	Total	42.005	94.238	121.482	151.466	185.617	184.191
Mundial		13.074.679	24.382.522	32.417.781	44.297.145	59.037.416	66.633.253

Introdução

Em média, a aquacultura forneceu 9,41kg de "food fish" por pessoa, para consumo, em 2012. No entanto, a distribuição da produção é desigual em termos mundiais e dentro de cada continente. A Europa é um dos continentes onde a produção de "food fish" teve um aumento mais lento que pode estar associado a taxas de natalidade baixas e a um envelhecimento da população ativa no setor da agricultura, o que se traduz num número menor de pessoas envolvidas na aquacultura e pesca.

Uma das necessidades mais importantes em qualquer maternidade de peixes, crustáceos, moluscos, entre outros, é a obtenção constante de microorganismos vivos para alimentação de elevada qualidade e preço razoável, visto que a produtividade da maternidade está intimamente relacionada com a quantidade e qualidade da fonte de alimento (13). A taxa de sobrevivência e o correto desenvolvimento dos animais em aquacultura estão diretamente relacionadas com a qualidade do alimento fornecido nos estádios de vida iniciais das diferentes espécies, sendo que quanto melhor é a qualidade, maior é a taxa de sobrevivência e melhor é o desenvolvimento. Em aquacultura é frequente o uso de microalgas como primeiro alimento, dado serem os principais produtores primários dos ecossistemas aquáticos, constituindo a base da cadeia trófica marinha (33).

As microalgas devem preencher um determinado número de requisitos para serem úteis para espécies em aquacultura, no que toca à sua nutrição: devem ter um tamanho e forma adequados à ingestão e digestão (devem ter uma parede celular digerível para tornar os nutrientes facilmente disponíveis) (1), elevadas taxas de crescimento e serem passíveis de cultura massiva. A estabilidade em situações de variação de temperatura, luz e perfil de nutrientes, que ocorrem frequentemente em sistemas de incubadoras, é também um parâmetro necessário. Por último, devem ter qualidades nutricionais apropriadas e ausência de toxinas, que, de outro modo, podem ser acumuladas ao longo da cadeia trófica (1).

Por cumprirem os requisitos supramencionados, são frequentemente usadas em aquacultura microalgas como *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Chlorella sp.*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella sp.*, *Rhodomonas sp.*, *Tetraselmis sp.* e *Nannochloropsis sp.*(33).

As microalgas são a principal fonte alimentar de larvas de moluscos e crustáceos e também do alimento vivo que é usado para alimentar as larvas de peixe. Elas contêm nutrientes essenciais que podem ser transferidos para níveis tróficos superiores (20).

O valor nutricional de uma dieta de microalgas está relacionado com a sua capacidade de fornecer macro e micronutrientes essenciais ao consumidor alvo, conduzindo a uma nutrição mais equilibrada e, em última instância, melhorando o desenvolvimento das espécies a quem se destinam. Deste modo, a escolha das microalgas a usar em aquacultura deve ser cuidadosa, tendo sempre presente que esta escolha deve ir ao encontro das necessidades nutricionais do consumidor alvo, pois as larvas de diferentes espécies têm distintas necessidades nutricionais (34).

De facto, as microalgas são necessárias na nutrição de larvas durante um breve período de tempo, quer para consumo direto, no caso de larvas de moluscos, crustáceos e peixes, quer para consumo indireto (21) (Figura 1). O consumo indireto das microalgas passa pelo fornecimento destas ao zooplâncton, nomeadamente rotíferos, artémia e copépodes, que constitui o alimento vivo das larvas de peixe. As microalgas comumente usadas para a produção em massa de rotíferos são ricas em ácidos gordos PUFA ómega 3, maioritariamente representados por EPA e DHA (22). Uma vez que os rotíferos e artémia são naturalmente deficientes em PUFA, pois não os sintetizam em quantidades suficientes para suprir as necessidades das larvas (20), é necessário enriquecê-los com estes ácidos gordos essenciais antes de os fornecer às larvas de peixe (21). As necessidades lipídicas das larvas de peixe, em particular de PUFA, prendem-se com o facto dos animais marinhos serem incapazes de sintetizar PUFA de cadeia longa, fruto duma possível deficiência em dessaturase $\Delta 5$ de ácidos gordos, o que limita o seu crescimento e pode afetar negativamente as taxas de fecundidade destes animais. Ácidos gordos de cadeia mais curta, como os ácidos α - (C18:3 n-3) (ALA) e γ -linolénico (C18:3 n-6) (GLA), também presentes nas microalgas, são eficazes para sobrevivência e crescimento satisfatório de alguns animais, nomeadamente bivalves (1).

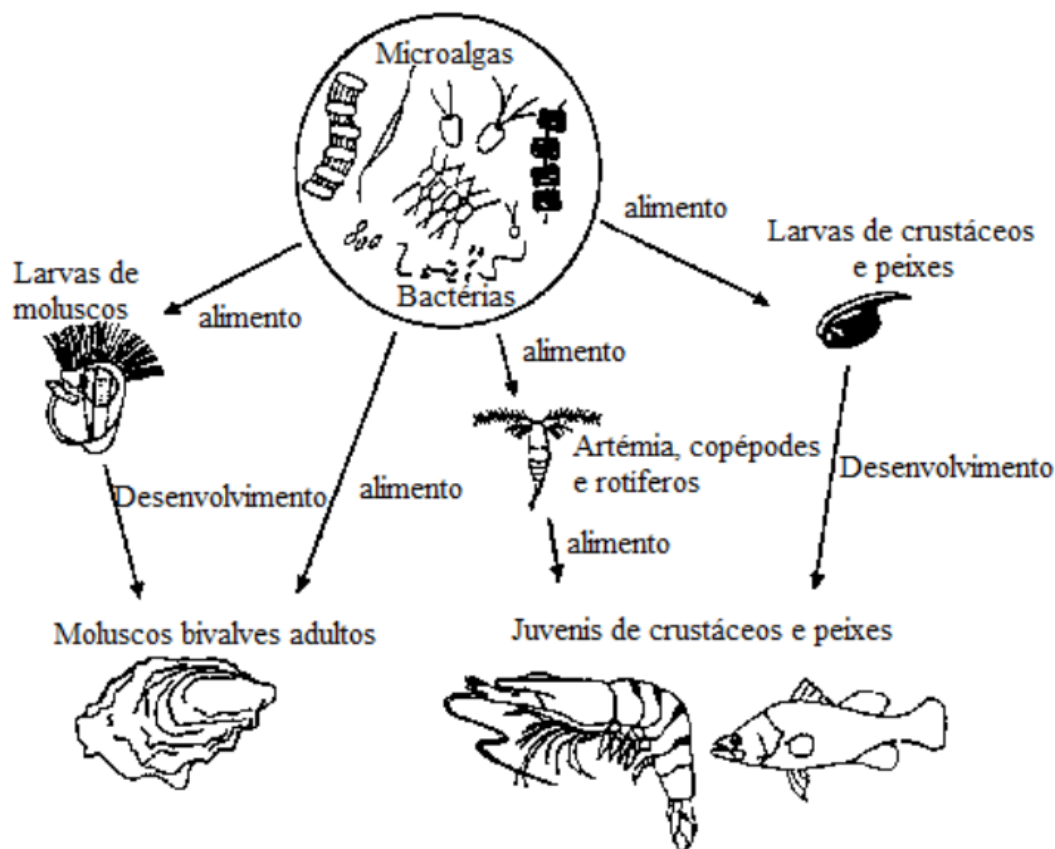


Figura 1. Aplicações alimentares e nutricionais das microalgas no contexto de aquacultura. [Adaptado de Correia 2013 (5)].

Apesar das larvas de peixes marinhos necessitarem de PUFA na sua dieta, elas também necessitam de fosfolípidos, que podem ser igualmente fornecidos pelas microalgas. Este facto está provavelmente relacionado com a capacidade limitada das larvas de peixe de sintetizarem fosfolípidos *de novo* (20).

Para além das microalgas serem uma importante fonte nutricional para as larvas de moluscos, crustáceos e peixes em aquacultura, e também para o zooplâncton, elas também ajudam a estabilizar e melhorar a qualidade do meio de cultura. Na realidade, para várias espécies de animais aquáticos, a introdução de fitoplâncton rico em microalgas nos tanques de cultura conduz a melhores resultados no que diz respeito a taxas de sobrevivência e crescimento, num processo conhecido como "*Green Water Technique*". As razões pelas quais estes fenómenos se observam não estão elucidadas, mas podem incluir um melhoramento e estabilização da qualidade da água, ação de alguns compostos bioquímicos excretados para o meio, como hormonas de crescimento e vitaminas, indução

de processos comportamentais, tais como a captura de alimento vivo, a regulação da população bacteriana, efeitos probióticos e estimulação do sistema imunitário (35).

As microalgas são também usadas para refinar produtos da aquacultura, ou seja, melhorar as qualidades do produto final produzido: um exemplo são as dietas artificiais. Estas carecem de fontes naturais de pigmentos, essenciais para vários organismos marinhos. Daí que a ingestão de microalgas com pigmentos específicos permite a organismos como o salmão e a truta adquirirem a sua cor característica. Sem essa cor, o valor de mercado destes peixes diminui significativamente, pelo que estes pigmentos devem ser fornecidos via dieta (36).

1.3. Produção e Conservação de microalgas para aquacultura

Nas maternidades, a cultura de microalgas é atualmente feita em sacos de polietileno ou cilindros transparentes em fibra de vidro, prevalentemente sob luz artificial. Em empresas dedicadas à produção de microalgas ou em unidades especializadas, os fotobiorreatores (PBR) e os "*open ponds*" são usados para a produção em massa de microalgas (4) (Figura 2).

Os "*open ponds*" são essencialmente, tanques de elevada capacidade que, embora sejam mais baratos e fáceis de operar que os PBR, apresentam algumas desvantagens, tais como uma densidade celular baixa da cultura, um grau de contaminação elevado e uma exposição solar desigual, já que apenas as células à superfície é que estão realmente expostas (30).

Os PBR podem ser definidos como sistemas de cultura para organismos fototróficos, nos quais uma grande proporção de luz (natural, artificial ou combinada) não incide diretamente na superfície da cultura, mas tem de atravessar as paredes transparentes do reator para atingir as células da cultura. Consequentemente, os PBR não permitem, ou limitam fortemente, as trocas de gases e contaminantes entre a cultura e a atmosfera. Os PBR permitem um controlo muito superior das condições de cultivo, quando comparados com os "*open ponds*". Existem vários tipos de PBR, cada um adequado a um conjunto de parâmetros, entre os quais as condições atmosféricas e a cultura usada (1).

Introdução

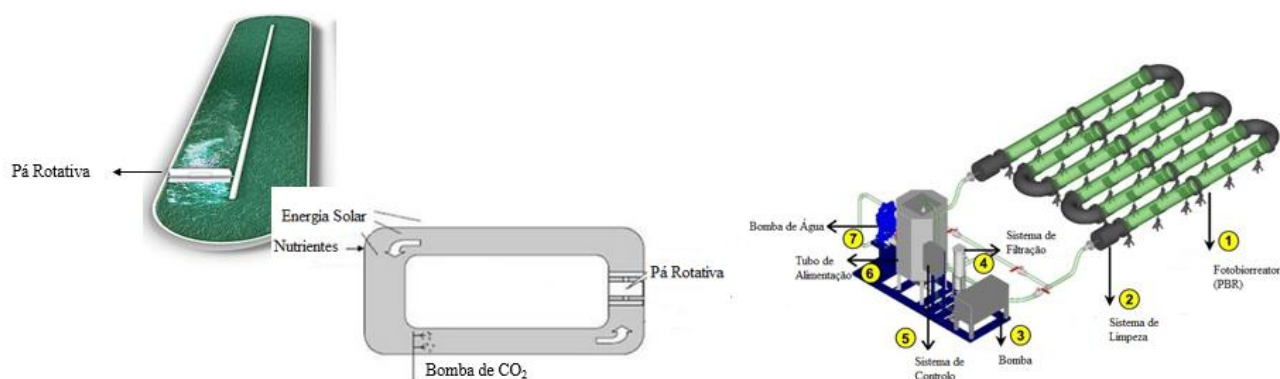


Figura 2. Representação de métodos usados na produção em massa de microalgas: “Open ponds” (à esquerda) e Fotobiorreator (PBR) Tubular (à direita).

O uso de alimento vivo em aquacultura é um fator fundamental para o sucesso em estados larvares de peixes e crustáceos; no entanto, a manutenção de culturas vivas de microalgas em maternidades tem algumas desvantagens, nomeadamente o seu elevado custo, podendo representar até 30% dos custos totais de produção das maternidades (13).

Nas últimas décadas, este problema tem promovido vários estudos sobre o desenvolvimento de fontes alternativas às microalgas vivas. Dentre estas fontes alternativas, os concentrados de microalgas, sob a forma de pastas, por exemplo, são potenciais substitutos parciais ou mesmo totais das culturas vivas.

Tabela 3. Exemplos de algumas empresas, a nível mundial, especializadas na produção de concentrados de microalgas para uso em aquacultura.

Empresa	Reed Mariculture (EUA)	Innovative Aquaculture Products, LTD (Canadá)	Necton S.A., Companhia Portuguesa de Culturas Marinhas (Portugal)
Designação do produto	<ul style="list-style-type: none"> - Instant Algae® - Instant Algae® Premium 	<ul style="list-style-type: none"> - Greenwater formula® - Enrichment formula® - Starter formula® - Spat formula® 	<ul style="list-style-type: none"> - PhytoBloom Green Formula® - PhytoBloom Ice® - PhytoBloom Prof®

Estes concentrados podem ser obtidos por diferentes métodos, sendo que a centrifugação é o método mais comum (37). Existem várias empresas, mundialmente distribuídas, especializadas na produção de concentrados e pastas de microalgas, essencialmente para uso em aquacultura (Tabela 3).

Os desafios atuais das empresas produtoras de concentrados de microalgas prendem-se com a conservação e armazenamento destes concentrados, daí que o passo crucial na produção e comercialização de algas preservadas é o desenvolvimento de métodos de conservação que não alterem o valor nutricional característico das algas vivas e que permitam a extensão do tempo de prateleira (1).

A maioria das técnicas de conservação de produtos visa controlar a ocorrência de todas as formas de deterioração, sendo sempre prioritário minimizar qualquer crescimento de microorganismos. As reações de deterioração podem levar a alterações indesejáveis da cor, sabor e aroma do produto, bem como a perdas nutricionais, conduzindo, em última instância, à degradação total do produto. Estas reações podem ocorrer em qualquer uma das etapas do processo de produção, desde a aquisição de matérias-primas até ao eventual armazenamento do produto acabado (13). Estas incluem reações de ordem física, química, enzimática e microbiológica, que serão descritas de seguida.

1.3.1. Reações químicas de degradação de microalgas

As reações químicas envolvidas no processo de degradação de microalgas incluem desnaturação de proteínas e ácidos nucleicos e oxidações não enzimáticas (38).

A desnaturação das proteínas e dos ácidos nucleicos ocorre por modificações estruturais e conformacionais e por ação de agentes como as espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Ambos implicam a perda de propriedades funcionais e, em última análise, a morte celular (38).

As oxidações não enzimáticas estão associadas a reações entre biomoléculas, como os lípidos, proteínas ou pigmentos, com espécies reativas de oxigénio ou com moléculas de oxigénio presentes na atmosfera do produto (39). Estas reações ocorrem principalmente a nível lipídico e sobretudo nos PUFA (auto-oxidação). A degradação oxidativa de pigmentos, especialmente clorofilas, é um dos processos responsáveis pela alteração da cor do produto. Na realidade, a degradação de clorofilas tem como resultado compostos

intermédios como a feofitina, o feoforbídeo e a clorofilida, de cor acastanhada, com consequente alteração do aspeto, valor nutricional e comercial das microalgas (14).

1.3.2. Reações enzimáticas de degradação de microalgas

As reações enzimáticas associadas a degradação de biomoléculas em microalgas podem ser provocadas pelas enzimas da própria microalga ou pelas enzimas exógenas libertadas pelos microorganismos que possam estar presentes no produto (38).

Existem essencialmente dois grupos de enzimas associados a estas reações: hidrolases, nomeadamente lipases e proteases, e oxidases, mormente lipoxigenases e a polifenol oxidase (PPO). A PPO catalisa a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, que rapidamente polimerizam em melanoidinas, reação conhecida como acastanhamento enzimático (39). Uma vez que o acastanhamento enzimático pode afetar a cor, sabor e valor nutricional dos alimentos, pode ter um grande impacto económico. A velocidade da reação de acastanhamento é dependente do conteúdo em polifenol oxidase ativa existente nos tecidos, bem como da temperatura, pH e disponibilidade de oxigénio. O controlo desta reação passa por um maior conhecimento sobre as propriedades da enzima envolvida, dos seus substratos e inibidores; daí que o controlo do acastanhamento enzimático pode ser feito por diminuição ou mesmo inibição da polifenol oxidase, por eliminação dos componentes essenciais ao seu funcionamento: redução da temperatura e/ou pH, manipulação dos substratos de reação, nomeadamente pela adição de ácido ascórbico, que não eliminando os compostos fenólicos, reduz a sua passagem a quinonas (38).

1.3.3. Fatores que influenciam a degradação de microalgas

Para além das reações de deterioração descritas anteriormente, existem também fatores intrínsecos e extrínsecos que contribuem para a diminuição do prazo de validade não só de produtos confeccionados com base em microalgas, mas de produtos alimentares no geral. As alterações quantitativas e qualitativas do produto, bem como a velocidade a que ocorrem dependem de fatores associados não só ao produto, mas também ao ambiente onde ele se encontra (38). Dentre os fatores intrínsecos, destacam-se a natureza e qualidade

das matérias-primas, visto que matérias-primas de elevada qualidade com um número baixo de microorganismos presentes devem resultar em produtos com um tempo de prateleira aceitável. Se o número de microorganismos com potencial para deteriorar o produto é altamente variável, este facto pode ter um impacto significativo no processamento e conservação das microalgas e, conseqüentemente, no tempo de prateleira (40). A formulação do produto pode também exercer influência, incluindo o uso de conservantes. É importante estar ciente de que a substituição ou remoção de ingredientes pode permitir o crescimento de microorganismos que previamente estava inibido (40). A disponibilidade de oxigénio e potencial de redução-oxidação dentro do alimento têm um papel preponderante no que é respeitante a tipos de microorganismos patogénicos ou causadores de degradação que irão crescer no alimento, dado que a composição da atmosfera intervém na natureza do metabolismo (aeróbio ou anaeróbio) dos microorganismos. Além disso, estes fatores têm igualmente impacto nas reações de oxidação-redução enzimáticas e não enzimáticas que causam rancidez, perda de vitaminas, acastanhamento e alterações de sabor no concentrado de microalgas (38,40). A disponibilidade de água é também um fator a ter em consideração, pois raras são as reações biológicas ou bioquímicas que podem ocorrer, com uma intensidade significativa durante períodos normais de armazenamento, quando a humidade relativa do produto é inferior a um certo limite crítico. Assim, os riscos de deterioração podem ser diminuídos por redução da disponibilidade e/ou atividade da água presente no produto (38). Por último, o pH, que influencia consideravelmente as atividades enzimáticas e o desenvolvimento microbiano. Os meios ácidos são geralmente favoráveis a uma boa conservação (40).

Os principais fatores extrínsecos envolvidos na degradação de produtos alimentares englobam o tipo de embalagem, incluindo o ambiente gasoso do produto final, após o embalamento. O embalamento tem um papel primário de proteção do produto após o processamento, mas pode também ser usado para aumentar o tempo de prateleira, impedindo, por exemplo, a degradação do produto por exposição à radiação UV solar (40). A temperatura de armazenamento também é um fator relevante. Neste parâmetro incluem-se a temperatura ambiente, a temperatura de refrigeração ou temperatura de congelamento. Ao passo que o armazenamento em arcas congeladoras irá parar o crescimento de quase todos os microorganismos que possam causar deterioração, a refrigeração irá apenas desacelerar o seu crescimento (13,38). Além disso, a constante de velocidade das reações

químicas é diretamente proporcional à temperatura, pelo que um pequeno incremento de temperatura pode ter efeitos nocivos para o concentrado de microalgas, tais como a aceleração das reações de degradação (38). Por último, o tempo relacionado com o conceito de velocidade de reação, cujo conhecimento é indispensável, no sentido de determinar a duração máxima provável dum produto alimentar, dado que quanto mais rápido ocorrem as reações de degradação, menor é o tempo de prateleira do produto (38).

1.3.4. Métodos de conservação de microalgas

O Codex Alimentarius define tempo de prateleira como "o período máximo entre a manufatura e a data de consumo do produto". Este período é o intervalo de tempo no qual o produto mantém as suas qualidades microbiológicas e organolépticas (41). Para a extensão do tempo de prateleira dum produto são empregues técnicas de conservação físicas e químicas, que visam, essencialmente, controlar a ocorrência de deterioração do produto.

1.3.4.1. Métodos de conservação físicos

Os métodos de conservação físicos de produtos alimentares consistem na refrigeração, redução da atividade da água e modificação da atmosfera do produto. A refrigeração é apontada como um método de conservação, dado que a maioria das reações químicas são dependentes da temperatura, portanto quando a temperatura decresce, o número de reações químicas também decresce. Já que a degradação dos alimentos é normalmente resultado que reações mediadas por microorganismos ou enzimas endógenas, o tempo de vida dos alimentos pode ser incrementado por armazenamento a baixas temperaturas. A temperatura de refrigeração é normalmente próxima, mas superior, ao ponto de congelação, situando-se entre os 0 e os 5°C (37,38). A refrigeração, e mesmo a congelação, podem, no entanto, conduzir a alterações no perfil bioquímico dos concentrados de microalgas. Welladsen *et al* (13) demonstraram que após dois meses de congelação ou de refrigeração se verificavam alterações significativas no perfil de ácidos gordos dum concentrado de *Nannochloropsis sp.*

A atividade da água expressa o grau de disponibilidade de água num produto. Como os microorganismos no geral necessitam de um ambiente aquoso para crescerem, um valor baixo de atividade da água limita o seu desenvolvimento. Para se reduzir a atividade da água, podem-se adicionar sais, como o cloreto de sódio ou o cloreto de

potássio, ou açúcares, como a sacarose ou a glucose. Pode-se igualmente secar, liofilizar ou congelar o produto (37).

A modificação da atmosfera pode ser feita por embalagem em vácuo. Este tipo de embalagem permite retirar o ar, retirando assim o oxigênio, o que irá inibir as bactérias exclusivamente aeróbias e atrasar o crescimento das bactérias aeróbias facultativas. O produto é geralmente colocado numa embalagem que é selada após se retirar o ar. Como o oxigênio está envolvido em reações químicas com componentes do produto, a utilização de técnicas de conservação com vácuo permitem reduzir a ocorrência de oxidações não enzimáticas. O dióxido de carbono pode também ser usado no embalagem em vácuo, dado que inibe o crescimento de um grande número de microorganismos (38).

1.3.4.2. Métodos de conservação químicos

Os objetivos da conservação química são a segurança do concentrado, que resulta da inibição do desenvolvimento de microorganismos patogénicos eventualmente presentes e da produção de toxinas, bem como a estabilização organolética do concentrado, que resulta da inibição de microorganismos causadores de deterioração e da desaceleração das reações de degradação de origem não microbiológica. Os métodos de conservação químicos de produtos alimentares recorrem, essencialmente, ao uso de aditivos alimentares com várias funções (39). Aditivo alimentar é qualquer substância não consumida normalmente como alimento e não usada normalmente como um ingrediente. A adição de aditivos aos alimentos é sempre intencional, tendo um objetivo tecnológico no fabrico, processamento, preparação, tratamento, embalagem e/ou transporte do produto em questão (37,38).

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), os aditivos alimentares estão distribuídos em seis classes, em concordância com a função que desempenham. Há que reforçar que esta classificação não é rígida, visto que um aditivo pode desempenhar mais do que uma função. Assim, os aditivos podem ser classificados como conservantes, aditivos nutricionais, agentes colorantes, agentes intensificadores de sabor, agentes que conferem textura, que englobam emulsionantes e estabilizadores e agentes diversos, que incluem agentes quelantes, enzimas, agentes anti-espuma, catalisadores, solventes, lubrificantes entre outros (39). Irá ser descrita mais pormenorizadamente a classe dos conservantes, dado que estes são um dos focos deste trabalho. A classe dos conservantes

Introdução

está subdividida em três grupos de aditivos: os agentes antimicrobianos, os antioxidantes e os agentes anti-acastanhamento.

Os agentes antimicrobianos são adicionados aos alimentos com dois objetivos: controlar a degradação natural dos alimentos e/ou controlar a contaminação por microorganismos, incluindo agentes patogênicos. Alguns exemplos de antimicrobianos são o ácido benzóico, o ácido sórbico e os derivados sorbato de sódio e sorbato de potássio (38,39).

Os antioxidantes são outro subgrupo dos conservantes, essencial para a extensão do tempo de prateleira de vários produtos alimentares, entre os quais produtos baseados em microalgas. Os antioxidantes evitam a oxidação das moléculas ao doarem um átomo de hidrogénio ou um eletrão, ficando eles próprios reduzidos sob a forma de radical mas, ao contrário de outros radicais, os antioxidantes na forma de radical são estáveis e não permitem que as reações de oxidação continuem, preservando assim o *status quo* do sistema (14). Os antioxidantes alimentares são usados para prolongar o tempo de vida do produto e impedir a degradação do produto sem alterar o sabor ou o cheiro dos alimentos ou modificar o seu aspeto (39). Os antioxidantes alimentares mais comuns são o ácido ascórbico, o ascorbato de sódio e o ascorbato de cálcio, tocoferóis, nomeadamente o α -, γ - e δ -tocoferol, o ácido cítrico, citrato de sódio, citrato de potássio e citrato de cálcio (38,39). A peroxidação lipídica e rancidez são os tipos de oxidação mais frequentes em produtos alimentares enquanto eles estão armazenados. Para inibir especificamente a peroxidação lipídica e rancidez, são normalmente adicionados a produtos alimentares antioxidantes como o butil-hidroxianisol (BHA) ou o butil-hidroxitolueno (BHT) (39).

Os agentes anti-acastanhamento são usados como aditivos alimentares para evitar o escurecimento dos alimentos, que pode ocorrer a qualquer momento durante o manuseamento, processamento e/ou armazenamento de produtos alimentares. Dentre os agentes anti-acastanhamento mais usados, destacam-se os sulfitos. A alternativa ao uso de sulfitos é a utilização de compostos naturais, nomeadamente o ácido eritórbico, estereoisómero do ácido ascórbico, e a cisteína, aminoácido que reage com os intermediários quinolona, inibindo a formação de compostos posterior; alguns ácidos fenólicos e o 4-hexilresorcinol, um composto orgânico (38,39).

2. Objetivos

2. Objetivos

Na empresa onde o estágio curricular decorreu, Necton, Companhia Portuguesa de Culturas Marinhas, S.A., são produzidas diferentes microalgas, quer marinhas, quer de água doce, entre as quais se destacam: *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis sp.* e *Phaeodactylum sp.*. Estas microalgas, em função da sua aplicação, são comercializadas em três formulações: concentrados refrigerados, pastas congeladas e em pó (microalgas liofilizadas). Em nenhuma destas formulações são usados conservantes químicos de qualquer espécie.

O principal objetivo do presente estudo foi melhorar o sistema de conservação do produto PhytoBloom Green Formula®, concentrado da microalga *Nannochloropsis sp.*, de modo a aumentar o tempo de prateleira do mesmo. Atualmente este produto tem um prazo de validade de 4 semanas o que implica constrangimentos na gestão de stocks, no transporte e na posterior utilização por parte do cliente.

Foram testados diferentes métodos de conservação, como a refrigeração/congelamento e a adição de conservantes, e determinadas as alterações organolépticas (aspecto visual, odor, pH e capacidade de ressuspensão) e bioquímicas (perfil de ácidos gordos, quantificação de hidroperóxidos lipídicos, de clorofila a e carotenóides) dos concentrados ao longo do seu período de validade.

3. Materiais e Métodos

3. Metodologia

O plano de trabalho consiste em duas secções:

Fase 1: Avaliação organolética de PhytoBloom Green Formula® com e sem conservantes sujeito a refrigeração ou congelação: Avaliação do aspeto visual, odor, determinação da capacidade de ressuspensão e medição do pH das amostras correspondentes às diferentes condições ambientais em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Fase 2: Avaliação bioquímica de PhytoBloom Green Formula® com e sem conservantes a refrigeração ou congelação: Determinação das alterações do perfil bioquímico, nomeadamente do perfil de ácidos gordos, concentração de hidroperóxidos lipídicos e teor de clorofila a e carotenóides das amostras correspondentes às diferentes condições experimentais em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

A Fase 1 decorreu na empresa Necton S.A. durante 4 meses e a Fase 2 decorreu na Universidade de Aveiro durante 6 meses.

3.1. Preparação de PhytoBloom Green Formula®

A biomassa foi recolhida no dia 27 de Outubro de 2014 por centrifugação. Para obtenção do PhytoBloom Green Formula®, a biomassa recolhida foi misturada com uma solução salina, por um período superior a uma hora.

3.2. Preparação da solução de conservantes

Foi preparada uma solução contendo 4 aditivos alimentares com diferentes características: um aditivo alimentar com propriedades antioxidantes, outro com funções essencialmente antimicrobianas, um aditivo alimentar cuja função se centra na retenção das propriedades organoléticas do produto, como a cor e o cheiro e por último outro aditivo com função de agente antioxidante, antimicrobiano e regulador de acidez. A solução final de conservantes foi obtida após vários ensaios onde se averiguou a solubilidade dos conservantes usados, bem como as concentrações a usar, no sentido de obter uma solução final homogénea. O volume de PhytoBloom Green Formula® obtido foi dividido do seguinte modo: a 4,8 L foi adicionada uma solução salina, obtendo-se a solução inicial sem

conservantes e a 4,3 L foi adicionada a solução de conservantes descrita anteriormente, obtendo-se a solução inicial com conservantes.

3.3. Preparação das amostras a avaliar

Cada uma das soluções iniciais foi dividida em 18 embalagens iguais às que são usadas na comercialização de PhytoBloom Green Formula® 150mL, mimetizando as condições nas quais o produto comercializado se encontra. Das 18 amostras obtidas para cada solução inicial, 9 amostras foram colocadas num frigorífico doméstico (*Confortec, modelo CF240W*), com termómetro analítico incorporado, a $T=0-5^{\circ}\text{C}$. As restantes 9 amostras foram colocadas numa arca congeladora (*Fricon, modelo THC520*), com termómetro analítico incorporado, a $T=-18^{\circ}\text{C}$. O restante volume de cada uma das soluções iniciais foi usado para testes internos da empresa.

3.4. Avaliação organolética

3.4.1. Determinação de cor e cheiro

A determinação da cor das soluções foi feita por inspeção visual da embalagem. A atribuição da cor foi feita com auxílio ao sistema RAL, sistema de definição de cores europeu. Este sistema contém um catálogo de cores com descrição precisa, no qual é atribuído um código a cada cor. Este sistema, tal como outros sistemas de cores, permite a padronização da descrição de cores (42). A determinação e atribuição do cheiro das soluções foram feitas verificando-se se o cheiro permanecia inalterado (“cheiro caraterístico”) ao longo do ensaio.

3.4.2. Determinação da capacidade de ressuspensão

Para determinar a capacidade de ressuspensão das células presentes no concentrado, adicionou-se 1 L de água salgada autoclavada a um balão autoclavado. De seguida, pipetaram-se 500 μL de cada amostra, com posterior agitação. Seguidamente, verificou-se se havia ou não diluição completa da amostra.

3.4.3. Medição do pH

A medição do pH foi feita diretamente na embalagem, recorrendo a uma sonda de pH (*HANNA Instruments, modelo HI98103*).

3.5. Amostragem

Mensalmente foram retiradas amostras de 20 mL, de cada uma das réplicas das diferentes condições experimentais, para a avaliação da evolução dos parâmetros bioquímicos, nomeadamente perfil de ácidos gordos, quantificação de hidroperóxidos lipídicos, quantificação de clorofila a e de carotenóides (Figura 2). Foi efetuado um ensaio prévio no qual se mantiveram 3 amostras sem conservantes e 3 amostras com conservantes. No entanto, as amostras permaneceram viáveis durante apenas 11 dias, pelo que não foi possível efetuar análises bioquímicas destas amostras.

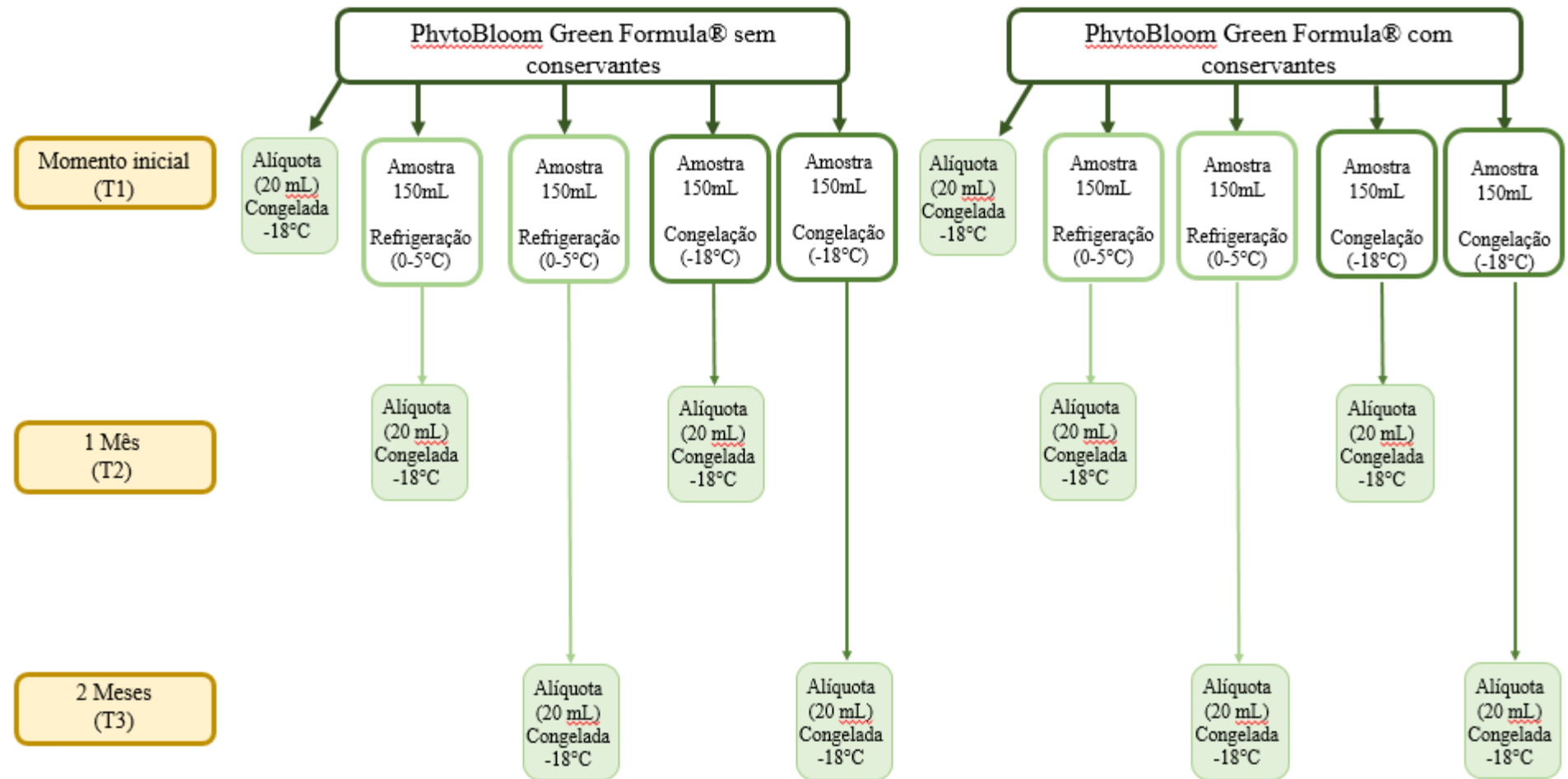


Figura 3. Esquema da recolha das alíquotas correspondentes a três pontos temporais (T1, T2 e T3).

As análises foram efetuadas meses depois da recolha das amostras, pelo que o momento inicial é designado T1. Da mesma forma, o segundo ponto temporal de recolha (1 mês de refrigeração ou de congelação) passa a ser denominado e o terceiro ponto temporal (2 meses de refrigeração ou de congelação) passa a ser designado T3 (Tabela 5).

Tabela 4. Designação dos três pontos temporais, recolha, análise e condições respetivas.

Designação	Recolha	Análise	Condições
T1	Momento inicial	4 meses após a recolha	4 meses de congelação (-18°C)
T2	Após 1 mês de refrigeração (0-5°C)	4 meses após a recolha	1 mês de refrigeração (0-5°C) + 4 meses de congelação (-18°C)
	Após 1 mês de congelação (-18°C)	4 meses após a recolha	5 meses de congelação (-18°C)
T3	Após 2 meses de refrigeração (0-5°C)	4 meses após a recolha	2 meses de refrigeração (0-5°C) + 4 meses de congelação (-18°C)
	Após 2 meses de congelação (-18°C)	4 meses após a recolha	6 meses de congelação (-18°C)

3.5.1. Reagentes

O clorofórmio foi adquirido na *VWR Chemicals* à semelhança do *n*-hexano. O metanol foi adquirido na *Fisher Chemical* ao passo que a acetona foi adquirida na *Sigma-aldrich*. Adicionalmente, o ácido sulfúrico (96%, v/v) foi adquirido na *Farmitalia Carlo Erba*. Os solventes mencionados possuem qualidade indicada para análise em HPLC. O hidroxitolueno butilado (BHT) e o peróxido de hidrogénio foram adquiridos na *Sigma-aldrich*, o sulfato de ferro na *Merck*, o laranja de xilenol na *Fluka* e o cloreto de sódio na *Absolve*.

3.5.2. Extração de lípidos

O extrato lipídico total da amostra correspondente a cada condição experimental foi obtido por recurso ao método de extração *Bligh-Dyer* (43), com modificações. Iniciou-se o processo de extração com a ressuspensão de 1 mL de cada amostra de *PhytoBloom Green*

Formula® correspondente às diferentes condições experimentais contido num *ependorf* em 3,75 mL de uma solução 1:2 (v/v) clorofórmio:metanol, seguida de agitação no vórtex durante 1 minuto. Após agitação em vórtex, incubaram-se as amostras durante 30 minutos em gelo. A seguir à incubação em gelo, as amostras foram novamente sujeitas a agitação no vórtex durante 30 segundos e de seguida houve adição de 1,25 mL de clorofórmio e nova agitação no vórtex durante 1 minuto. Seguidamente, foram adicionados a cada tubo 750 µL de água miliQ, sendo estes posteriormente agitados no vórtex durante 1 minuto. Seguiu-se a centrifugação (*Mixtasel P-Selecta*) dos tubos durante 5 minutos a 1000 rpm a fim de formar duas fases: fase superior – *aquosa* – e fase inferior – *orgânica*, contendo os lípidos. Após a transferência da fase inferior para um novo tubo, adicionou-se 1,88 mL de clorofórmio ao tubo inicial contendo a fase aquosa de forma a aumentar ainda mais a rentabilidade do processo de extração e extrair a maior quantidade possível de lípidos. Seguiu-se uma segunda centrifugação (*Mixtasel P-Selecta*) nas mesmas condições da anterior e transferiu-se a nova fase orgânica para o respetivo tubo contendo a fase orgânica obtida na primeira centrifugação, combinando, assim, ambas as fases. Posteriormente secou-se o extrato lipídico total de cada amostra sob corrente de azoto. Após a evaporação completa do solvente, seguiu-se a ressuspensão do extrato lipídico de cada tubo em 300 µL de clorofórmio e a transferência do resultado para um *vial*, repetindo esse passo de lavagem por mais 1 vez num total de 2. Por fim, secou-se, no *vial*, o extrato lipídico total de cada condição experimental na corrente de azoto e armazenou-se a -4°C para posterior análise.

3.5.3. Quantificação de ácidos gordos por GC-FID

A análise de ácidos gordos constituintes do extrato lipídico total de cada condição experimental foi conseguida por recurso a cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama (GC-FID, do inglês *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*). Para tal tornou-se necessário derivatizar a amostra, nomeadamente através da transmetilação de ácidos gordos esterificados a fim de tornar os mesmos voláteis e permitir, assim, a sua análise por GC-FID. O processo de transmetilação seguiu as linhas gerais da metodologia proposta pela União Internacional da Química Aplicada (IUPAC) (44). De forma breve, baseia-se na adição de hidróxido de potássio em metanol com o intuito de formar ésteres metílicos de ácidos gordos (44). Para tal transferiu-se um volume

determinado, correspondente a 30 µg de lípidos totais, do extrato lipídico de amostra de cada condição experimental, para um tubo previamente lavado com *n*-hexano, em duplicado, secando-se, em seguida, na corrente de azoto de modo a evaporar completamente o clorofórmio adicionado aquando a ressuspensão da amostra. Seguiu-se a adição de 1 mL de *n*-hexano a cada tubo e prosseguiu-se com a adição de 200 µL de hidróxido de potássio (2 M) em metanol e, posterior, agitação vigorosa em vórtex durante 2 minutos. De seguida, adicionaram-se 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio com agitação em vórtex durante 1 minuto. Seguiu-se a centrifugação (*Mixtasel P-Selecta*) dos tubos durante 5 minutos a 2000 rpm a fim de formar duas fases: fase inferior – *aquosa* – e fase superior – *orgânica*. Prosseguiu-se com a transferência da fase superior, na qual se encontram os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME, do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*) para um *ependorf* previamente lavado com metanol, secando-se, de seguida, na corrente de azoto de modo a permitir a evaporação completa do solvente. Por fim, ressuspendeu-se cada amostra em 30 µl de *n*-hexano, tendo-se injetado somente 5 µl desta solução num cromatógrafo gasoso acoplado a um detetor de ionização de chama (*PerkinElmer, modelo Clarus 400*). O cromatógrafo gasoso encontra-se equipado com uma coluna capilar DB-1 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, e 0,1 µm de espessura (*J&W Scientific*). A injeção das amostras foi manual e o tempo total de corrida foi de 19,20 minutos. O programa de temperaturas utilizado corresponde ao seguinte: temperatura inicial de 50°C, na qual se mantém durante 3 minutos, seguida de aumento a uma taxa de 25°C/minuto até atingir a temperatura de 180°C, na qual se mantém durante 6 minutos, seguida novamente de aumento à taxa de 40°C/minuto até à temperatura de 260°C, na qual se mantém durante 3 minutos. A identificação do perfil em ácidos gordos para cada condição experimental em estudo foi efetuado por comparação dos cromatogramas obtidos com o cromatograma de uma mistura de padrões de ácidos gordos obtido no mesmo aparelho com o mesmo programa, tendo-se prosseguido com a integração dos picos do cromatograma a fim de determinar a percentagem de cada ácido gordo em função da área total dos picos.

3.5.4. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II

De modo a avaliar a peroxidação lipídica, indicativa da ocorrência de *stress* oxidativo, procedeu-se à quantificação de hidroperóxidos lipídicos como produtos que se formam em primeira instância durante a oxidação de lípidos. Para tal recorreu-se ao ensaio de FOX II (do inglês, *Ferric-Xylenol Orange*), o qual consiste na oxidação de Fe(II) a Fe(III) na presença de hidroperóxidos, com posterior formação de um complexo laranja – com máximo de absorvância a 560 nm – entre o Fe(III) e o reagente de xilenol. Neste caso aplicou-se o método FOX II, de Jiang e seus colaboradores (45), uma vez que consiste numa ligeira adaptação do método inicial – FOX I – de forma a permitir a medição de hidroperóxidos em fases lipídicas. A quantificação de hidroperóxidos inicia-se com a preparação do reagente de FOX: laranja de xilenol (100 μ M), sulfato de ferro (250 μ M), hidroxitolueno butilado (4 mM) e ácido sulfúrico (25 mM) em metanol (90%, v/v) e água miliQ (10%, v/v). De forma breve, para 100 mL de reagente de FOX pesaram-se 9,8 mg de sulfato de ferro e transferiu-se para um copo isolado com papel de alumínio por sensibilidade à luz visível. Dissolveram-se em 139 μ L de ácido sulfúrico e 5 mL de água miliQ e procedeu-se à agitação com o auxílio de um agitador magnético. Seguiu-se a pesagem de 88,2 mg de hidroxitolueno butilado e 7,2 mg de laranja de xilenol, os quais foram adicionados à solução existente. Por fim, adicionaram-se 45 mL de metanol, 5 mL de água miliQ e os restantes 45 mL de metanol. Simultaneamente foram preparadas soluções padrão de concentração variável entre 0,01 e 0,4 mM de peróxido de hidrogénio (30%, m/v), para o cálculo da reta de calibração, a partir de uma solução padrão de peróxido de hidrogénio de concentração 1 mM, as quais foram adicionadas a 950 μ L de reagente de FOX. Para a quantificação de hidroperóxidos lipídicos nas diversas amostras adicionou-se 950 μ L de reagente de FOX, a 50 μ L do extrato lipídico obtido de cada condição experimental, correspondentes a 100 μ g de lípidos totais. Após incubação das amostras e dos padrões no escuro durante 30 minutos, foram transferidos 200 μ L de cada solução para uma microplaca de 96 poços, em duplicado, cuja leitura de absorvância a 560 nm foi efetuada com o auxílio de um leitor de microplacas (*Thermo Scientific Multiskan GO*). A determinação da quantidade de hidroperóxidos presente em cada amostra foi calculada por regressão linear através da representação gráfica da absorvância média dos

duplicados de cada padrão, no eixo Y, em função da respetiva concentração, no eixo X. A partir da equação da reta e da leitura de absorvância das amostras foi possível determinar a concentração de hidroperóxidos em cada condição experimental, a qual pode ser convertida em μg de hidroperóxido por mg de lípidos totais dividindo o resultado por 1000 e multiplicado o resultante por 34000 antes de dividir pela quantidade total de lípido total utilizada (100 μg) e multiplicar por 10, obtendo-se a concentração de hidroperóxidos lipídicos em μg por mg de lípidos totais.

3.5.5. Quantificação de pigmentos por espectrofotometria: quantificação de clorofila a e de carotenóides

Para a determinação dos pigmentos, a preparação das amostras foi feita em simultâneo. Resumidamente, foram recolhidos 2 mL de cada amostra num tubo, sendo os tubos seguidamente centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos. Após retirar o sobrenadante, foram adicionados ao pellet 5mL de acetona 90%. Posteriormente, os tubos foram sujeitos a agitação no vórtex durante 2 minutos. Após a agitação, os tubos foram envoltos em folha de alumínio e tapados com parafilme. Os tubos foram depois colocados no frigorífico (3°C) durante 1 hora. Terminada a incubação, os tubos foram novamente centrifugados durante 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi recolhido para um novo tubo e as amostras foram lidas num espectrofotómetro nos seguintes comprimentos de onda: 630, 645 e 665 nm para a determinação da clorofila a e 480 nm para a determinação dos carotenóides. Para determinar a concentração dos pigmentos analisados foi usada a fórmula descrita por Parsons e Strickland (46):

$$\text{Chl } a = 11,6 \times \text{Abs}(665\text{nm}) - 1,31 \times \text{Abs}(645\text{nm}) - 0,14 \times \text{Abs}(630\text{nm})$$

$$\text{Clorofila } a (\mu\text{g/mL}) = [\text{Chl } a \times V(\text{acetona})] / V(\text{amostra})$$

$$\text{C. totais} = 4 \times \text{Abs}(480\text{nm})$$

$$\text{Carotenóides totais } (\mu\text{g/mL}) = [\text{C. totais} \times V(\text{acetona})] / V(\text{amostra})$$

3.5.6. Análise estatística

Os resultados experimentais apresentam-se em termos de média \pm desvio padrão. As diferenças existentes entre as condições experimentais em estudo foram determinadas por recurso ao teste estatístico de *One-way ANOVA*, seguido do teste de Bonferroni para colunas selecionadas, com o auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism v5.0*. Considerou-se *valor-P* <0.05 enquanto indicador de significância estatística.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação organolética

Na realização da avaliação organolética foram usados critérios indiretos simples que permitem verificar a retenção da qualidade do produto armazenado, entre os quais o aspeto visual, odor, pH e capacidade de ressuspensão.

Tabela 5. Avaliação de cor, cheiro, pH e capacidade de ressuspensão de PhytoBloom Green Formula®, sem e com conservantes sujeito a refrigeração ou congelação.

		T1	T2	T3
Amostras refrigeradas (0-5°C) sem conservantes	pH:	6,56	6,44	6,24
	Cor:	RAL 6007	RAL 6006	RAL 6020
	Cheiro:	Caraterístico	Caraterístico	Caraterístico
	Ressuspensão:	Sim	Sim	Sim
Amostras refrigeradas (0-5°C) com conservantes	pH:	6,46	6,21	6,38
	Cor:	RAL 6007	RAL 6006	RAL 6020
	Cheiro:	Caraterístico	Caraterístico	Caraterístico
	Ressuspensão:	Sim	Sim	Sim
Amostras congeladas (-18°C) sem conservantes	pH:	6,56	6,62	6,80
	Cor:	RAL 6007	RAL 6006	RAL 6020
	Cheiro:	Caraterístico	Caraterístico	Caraterístico
	Ressuspensão:	Sim	Sim	Sim
Amostras congeladas (-18°C) com conservantes	pH:	6,46	6,56	6,70
	Cor:	RAL 6007	RAL 6006	RAL 6020
	Cheiro:	Caraterístico	Caraterístico	Caraterístico
	Ressuspensão:	Sim	Sim	Sim

A determinação do pH está sobretudo relacionada com a decomposição a nível microbiano, uma vez que a manutenção de pH baixo pode contribuir para a diminuição da ocorrência de degradação induzida por ação microbiana. Observou-se que em todas as amostras (Tabela 6), quer refrigeradas quer congeladas, não houve variação significativa do valor de pH nos três pontos temporais. Destaca-se ainda que estes valores se mantiveram dentro do intervalo considerado ideal (pH 5-8) (37), o que pode indicar que a carga microbiana que eventualmente estivesse presente nas amostras não exerceu efeitos degradativos relevantes, fenómeno este que pode ser confirmado pela inalteração do cheiro

das amostras nos três pontos temporais (Tabela 6). Efetivamente, a alteração do cheiro de concentrados e pastas de microalgas é, em grande parte, resultado de reações de degradação de origem microbiana (37). Este fenómeno pode ser fruto do armazenamento a baixas temperaturas, que conduz a uma desaceleração das reações de degradação provocadas por enzimas endógenas ou de origem microbiana.

É ainda e referir que as amostras nas quais se adicionaram conservantes apresentaram um valor de pH médio inferior ao das amostras sem conservantes, quer nas amostras refrigeradas, nas quais as amostras sem conservantes apresentavam um valor de pH de 6,41, ao passo que as amostras com conservantes apresentavam um valor de pH de 6,35, quer nas amostras congeladas, nas quais as amostras sem conservantes apresentavam um valor e pH de 6,66 e as amostras com conservantes um valor de pH 6,57. Esta diferença pode ser fruto das propriedades intrínsecas dos conservantes, já que alguns apresentam carácter ácido, podendo ser responsáveis pelo valor de pH inferior observado nas amostras às quais se adicionou conservantes.

A determinação da cor é um parâmetro indireto que permite avaliar o estado de degradação das amostras, em particular a degradação da clorofila. De facto, quando a clorofila sofre oxidação origina outros pigmentos, entre os quais o feoforbídeo, a feofitina e a clorofilida, pigmentos estes de cor acastanhada (47). Assim, a mudança de cor das amostras de verde para castanho pode sugerir que está a ocorrer a oxidação de clorofila. Nos resultados supra-representados (Tabela 6) pode-se observar uma mudança da cor atribuída às amostras nos diferentes pontos temporais, sendo que RAL 6007 é o código atribuído a PhytoBloom Green Formula® recém-preparado. No entanto, os 3 códigos do Sistema RAL atribuídos não traduzem uma modificação significativa da cor durante todo o tempo do ensaio (Figura 3). Esta manutenção da cor indica que, caso a clorofila tenha sofrido oxidação, esta não foi intensa.



Figura 4. Avaliação da cor das amostras de PhytoBloom green formula®, segundo o Sistema RAL, em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Por último, foi determinada a capacidade de ressuspensão das amostras em água salina autoclavada, dado esta ser usada no cultivo das microalgas. Esta permite avaliar, de forma indireta, a viabilidade e integridade de pastas e concentrados de microalgas. Quando as células estão sob *stress*, degradadas ou em processo de autólise – processos que podem ser resultantes de reações de degradação – estas tendem a agregar-se, formando aglomerados. Assim, quanto mais aglomerados estiverem presentes nas amostras, menor é a sua capacidade de ressuspensão, já que as células presentes nestes aglomerados dificilmente são ressuspensas. Por outro lado, a presença de materiais característicos da decomposição celular, como fragmentos de organelos, também dificulta a capacidade de ressuspensão. Nos resultados acima referidos, todas as amostras, foi efetuada a ressuspensão de todas as amostras com sucesso, independentemente das condições experimentais, indicando que as células permaneceram viáveis nos três pontos temporais.

Embora os parâmetros organoléticos indicados possam ser usados para uma avaliação indireta, estes resultados carecem de uma avaliação mais profunda e detalhada, cujos resultados permitam realmente avaliar a influência que os métodos de conservação usados neste estudo têm na qualidade e valor nutricional de PhytoBloom Green Formula®. Para tal, foi realizada uma avaliação de diferentes parâmetros bioquímicos, que se encontra descrita nas secções seguintes.

4.2. Quantificação de ácidos gordos por GC-FID

É de elevada importância a manutenção do perfil de ácidos gordos ao longo do tempo em produtos comercializados para aplicação em aquacultura, dado que o desenvolvimento correto dos animais é dependente do fornecimento suficiente de ácidos

gordos, particularmente PUFA ómega 3. No contexto deste trabalho, a quantificação dos ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula® foi efetuada em amostras recolhidas em 3 pontos temporais distintos, no sentido de avaliar a influência da refrigeração e congelação, bem como da adição de conservantes alimentares, no perfil qualitativo e quantitativo dos ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula®. A quantificação de ácidos gordos para cada uma das condições experimentais foi obtido por análises de GC-FID de ácidos gordos derivatizados por metilação. Sucintamente, analisaram-se amostras de PhytoBloom Green Formula® com e sem conservantes sujeitos a refrigeração ou congelação, em três pontos temporais diferentes. A análise dos cromatogramas resultantes permitiu a identificação dos ácidos gordos presentes nas diferentes amostras. A integração dos picos destes mesmos cromatogramas permitiu determinar a percentagem relativa de cada ácido gordo identificado nas condições em estudo e, deste modo, avaliar os efeitos quer dos métodos de conservação físicos aplicados (refrigeração e congelação), quer dos métodos químicos (adição de conservantes alimentares) no perfil de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula®.

Tabela 6. Abundância relativa de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula®, sem e com conservantes sujeito a refrigeração ou congelação.

	T1				T2				T3			
	Ref SC	Cong SC	Ref CC	Cong CC	Ref SC	Cong SC	Ref CC	Cong CC	Ref SC	Cong SC	Ref CC	Cong CC
C14:0	0,23±0,05	0,23±0,05	0,23±0,08	0,23±0,08	0,21±0,03	0,19±0,04	0,28±0,02	0,24±0,01	0,18±0,05	0,22±0,08	0,28±0,02	0,22±0,03
C16:0	30,56±0,38	30,56±0,38	29,87±0,22	29,87±0,22	30,72±0,38	30,72±0,80	29,85±0,54	29,13±0,83	30,56±0,64	29,89±0,65	29,85±0,12	29,8±0,35
C16:1	28,19±0,17	28,19±0,17	29,48±0,48	29,48±0,48	27,55±0,65	28,51±0,83	28,87±0,53	27,85±0,93	27,89±0,64	27,84±0,57	29,37±0,51	28,85±0,27
C18:1n9t	1,23±0,51	1,23±0,51	0,22±0,11	0,22±0,11	1,28±0,13	0,99±0,13	0,17±0,05	0,29±0,15	1,24±0,09	1,14±0,23	0,18±0,03	0,26±0,10
C18:2n6c	6,50±0,37	6,50±0,37	6,17±0,54	6,17±0,54	6,42±0,05	6,45±0,08	5,97±0,03	6,11±0,18	6,37±0,08	6,44±0,11	6,06±0,10	6,06±0,13
C18:2n6t	0,21±0,06	0,21±0,06	0,11±0,01	0,11±0,01	0,21±0,08	0,19±0,05	0,13±0,05	0,14±0,03	0,18±0,05	0,16±0,01	0,11±0,02	0,10±0,04
C18:3n6	0,13±0,01	0,13±0,01	0,17±0,07	0,17±0,07	0,16±0,09	0,12±0,03	0,18±0,08	0,12±0,01	0,18±0,08	0,10±0,03	0,16±0,06	0,14±0,02
20:3n3	0,24±0,02	0,24±0,02	0,18±0,02	0,18±0,02	0,13±0,05	0,21±0,03	0,21±0,01	0,20±0,04	0,17±0,04	0,19±0,01	0,21±0,01	0,18±0,02
20:4n6	24,13±0,54	24,13±0,54	25,32±0,21	25,32±0,21	23,89±0,39	24,03±0,89	25,05±1,34	24,63±0,50	24,22±0,11	23,86±0,65	24,55±1,02	25,13±0,39
20:5n3	1,65±0,18	1,65±0,18	1,98±0,34	1,98±0,34	1,55±0,11	1,54±0,39	1,49±0,21	1,66±0,53	1,39±0,18	1,46±0,33	1,61±0,06	1,82±0,43
Σn3	1,89±0,99	1,89±0,99	2,16±1,27	2,16±1,27	1,68±1,00	1,75±0,94	1,70±0,91	1,85±1,03	1,55±0,86	1,65±0,90	1,82±0,09	2,00±0,16
Σn6	30,96±11,33	30,96±11,33	31,77±11,93	31,77±11,93	30,68±11,20	30,79±11,28	31,33±11,80	31±1,60	30,95±11,37	30,56±11,21	30,87±11,56	31,43±11,85
%SFA	30,79	30,79	30,1	30,1	30,93	30,91	30,13	29,38	30,73	30,11	30,13	30,02
%MUFA	29,42	29,42	29,48	29,48	28,83	29,5	29,04	28,15	29,13	28,99	29,55	28,85
%PUFA	32,86	32,86	33,93	33,93	32,36	32,54	33,03	32,85	32,5	32,21	32,69	33,43

Abreviaturas: Ref SC (Refrigeração sem conservantes); Cong SC (Congelamento sem conservantes); Ref CC (Refrigeração com conservantes); Cong CC (Congelamento com conservantes); SFA (Ácidos gordos saturados); MUFA (Ácidos gordos mono-insaturados); PUFA (Ácidos gordos poli-insaturados)

Os ácidos gordos identificados nas amostras foram o ácido tetradecanóico (C14:0); o ácido hexadecanóico saturado (C16:0) e mono-insaturado (C16:1); o ácido octadecanóico mono-insaturado (C18:1), di-insaturado (C18:2) e tri-insaturado (C18:3) e por fim o ácido eicosanóico poli-insaturado (C20:3, C20:4 e C20:5) (Tabela 7). Estes resultados estão concordantes com o descrito na literatura para análises de *Nannochloropsis* (7,24). Pela análise da tabela supra-representada, é possível constatar semelhanças existentes no perfil de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula® nos três pontos temporais. De facto, não foram observadas diferenças estatisticamente no perfil de ácidos gordos do produto. Assim foi possível constatar que em todas as amostras os ácidos gordos C16:0, C16:1 e C20:4 representavam mais de 85% da percentagem total de ácidos gordos, observando-se assim uma prevalência de ácidos gordos de cadeia longa (Figura 5), concordante com estudos anteriormente efetuados (7,20). Destaca-se que o domínio dos ácidos gordos acima referidos é observável em todas as amostras, independentemente das condições experimentais.

De um modo geral, o perfil de ácidos gordos encontra-se de acordo com o esperado, no que toca aos ácidos gordos que foram identificados (20).

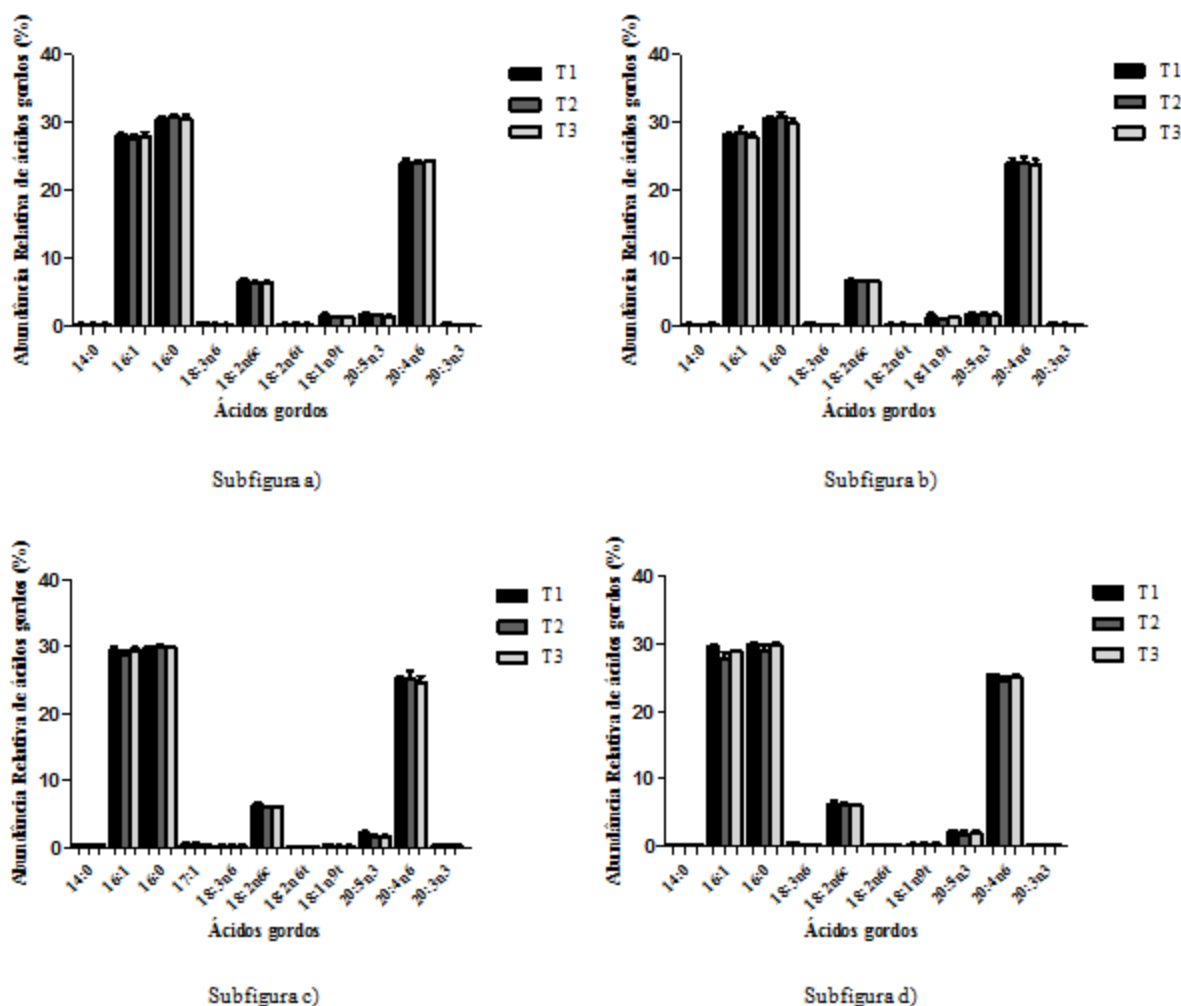


Figura 5. Abundância de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula®. Percentagem relativa dos ácidos gordos presentes em extratos de PhytoBloom Green Formula® sem e conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). A quantificação dos ácidos gordos foi obtida pela análise dos cromatogramas resultantes do estudo das amostras por GC-FID. Os resultados encontram-se representados em termos de média±desvio padrão de 3 amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Abundância de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura b): Abundância de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura c): Abundância de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura d): Abundância de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

No que é respeitante às diferentes classes de ácidos gordos, observa-se uma distribuição equitativa entre ácidos gordos saturados (SFA), mono-insaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA), com abundâncias relativas de cerca de 30%, 29% e 33%, respetivamente (Figura 6). Estes dados estão concordantes com os observados por Seychelles e os seus colaboradores (20), cujo estudo se focou em concentrados de *Nannochloropsis sp.* congelados durante 2 meses e a sua comparação com amostras frescas. Neste, verificou-se que nas amostras congeladas, a distribuição dos ácidos gordos nas diferentes classes era também equitativa, sendo 33,2% dos ácidos gordos totais ácidos gordos saturados, 31,6% ácidos gordos mono-insaturados e 35,2% ácidos gordos poli-insaturados.

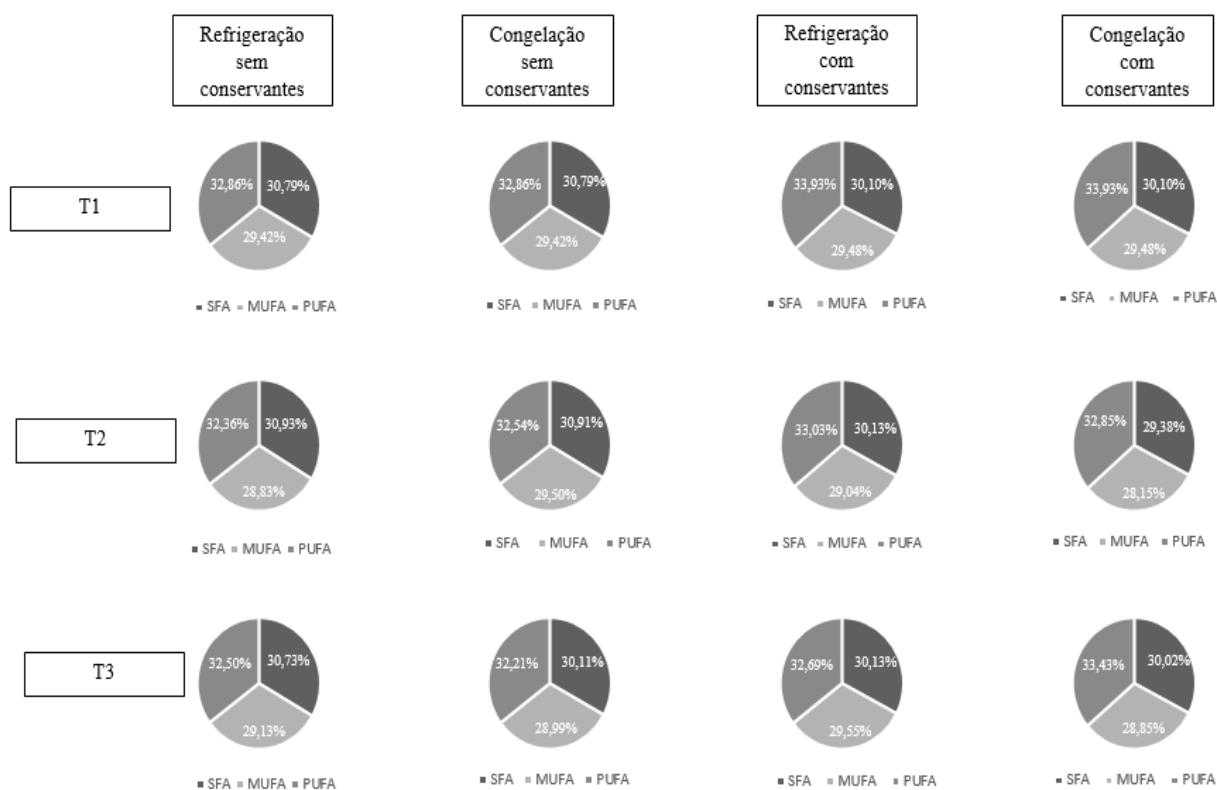


Figura 6. Distribuição das classes de ácidos gordos nas amostras de PhytoBloom Green Formula® sem e com conservantes, sujeitas a refrigeração e congelação, nos três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Abreviaturas: MUFA (ácidos gordos mono-insaturados); PUFA (ácidos gordos poli-insaturados); SFA (ácidos gordos saturados)

4.3. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos por FOX II

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) é uma constante nos organismos fototróficos, e as algas marinhas não são exceção (48). As ROS podem reagir com biomoléculas, conduzindo a reações oxidativas de degradação. Dentre as biomoléculas envolvidas nestas reações, os lípidos são o grupo de biomoléculas mais afetado (39,48).

Devido à importância dos lípidos, em particular dos ácidos gordos, no contexto de aquacultura, torna-se importante estudar métodos que permitam a estabilização e manutenção do perfil lipídico de algas e seus produtos derivados, promovendo assim a extensão do período de validade destas. Vários métodos podem ser empregues para determinar o grau de peroxidação lipídica das amostras, pois dependendo do método usado podem ser avaliados diferentes produtos e reações de oxidação de lípidos. Neste trabalho, utilizou-se o método de FOX II, que permite quantificar hidroperóxidos lipídicos, os primeiros produtos que se formam em resultado da oxidação dos ácidos gordos insaturados (49).

A análise foi efetuada nos extratos lipídicos totais correspondentes às amostras das diferentes condições experimentais. Os resultados foram obtidos em termos de μg de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) por mg de lípidos totais, tendo a análise sido efetuada em três amostras biológicas independentes (N=3).

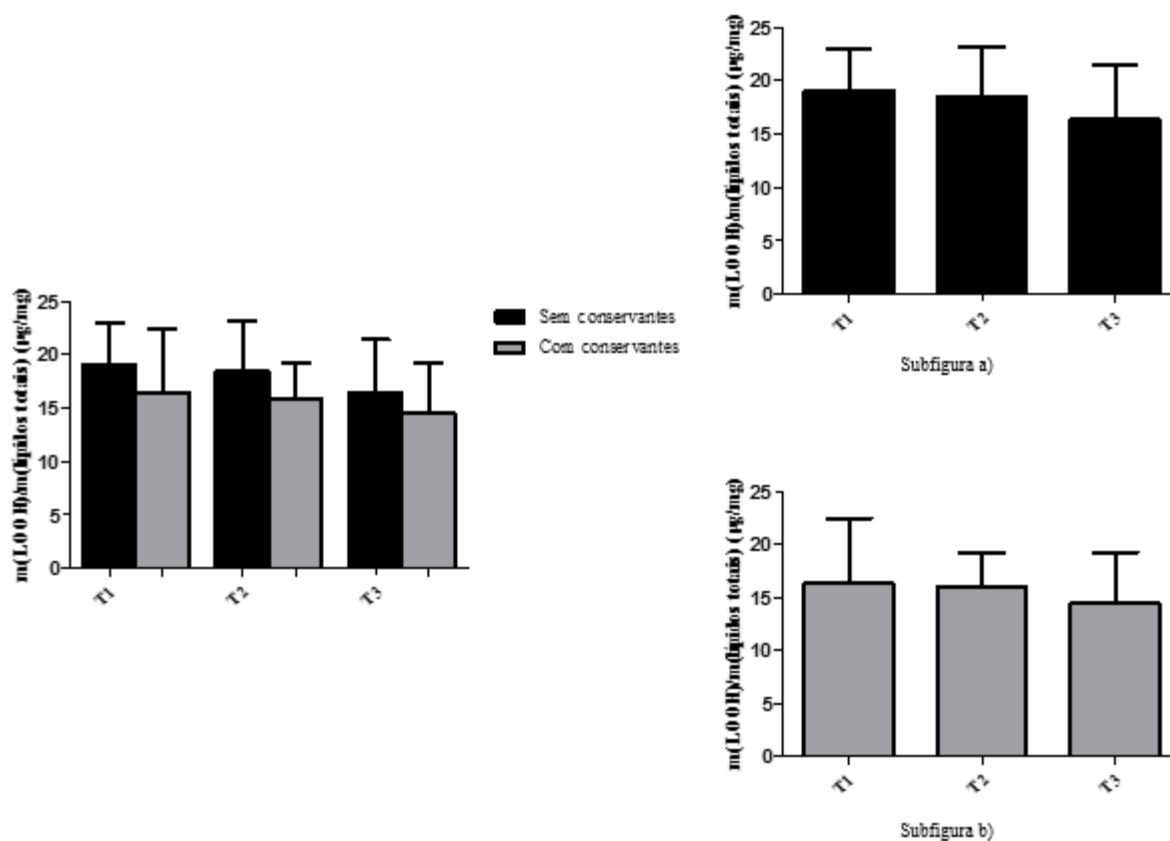


Figura 7. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C). Quantidade de hidroperóxidos lipídicos (LOOH, μg) por cada mg de lípidos totais presente no extrato de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso ao método de FOX II avaliou-se a formação de hidroperóxidos lipídicos em amostras sem e com conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura b): Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Como é possível constatar no gráfico acima representado (Figura 7), não se observaram variações significativas na quantidade de hidroperóxidos entre as amostras correspondentes aos três pontos temporais. No entanto, observa-se um menor grau de peroxidação das amostras com conservantes (Figura 7, Subfigura b)), sendo que a concentração de hidroperóxidos se manteve na ordem dos 16,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de lípidos totais, contrastando com as amostras sem conservantes (Figura 7, Subfigura a)), cuja concentração de hidroperóxidos foi de aproximadamente 18,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de lípidos totais nos

três pontos temporais. A refrigeração é frequentemente usada como método de conservação, uma vez que a maior parte das reações químicas é dependente da temperatura, pelo que quando a temperatura decresce, o número de reações químicas também decresce (38,39). Uma vez que as reações de degradação são normalmente, mediadas por microorganismos ou enzimas endógenas, o armazenamento a baixas temperaturas pode conduzir a uma extensão do tempo de prateleira. Não obstante, a combinação da refrigeração com a adição de conservantes demonstrou ser mais eficaz, observando-se um menor grau de oxidação nestas amostras (Figura 7). Este fenómeno pode ser consequência da ação de três conservantes com propriedades antioxidantes e um com propriedades antimicrobianas, podendo este último ter conduzido, em última instância, à diminuição da ocorrência de peroxidação lipídica mediada por microorganismos.

No que é respeitante às amostras congeladas (Figura 8), observou-se um fenómeno semelhante ao obtido nas amostras refrigeradas, não se observando variações estatisticamente significativas da concentração de hidroperóxidos nos 3 pontos temporais. As amostras sem conservantes (Figura 8, Subfigura a)), apresentam uma concentração de hidroperóxidos de aproximadamente 17,9 µg/mg de lípidos totais, indicando que, no que toca a amostras sem conservantes, a congelação parece ser mais eficaz na diminuição do grau de peroxidação lipídica. Este fenómeno era expectável, visto que a congelação conduz a uma desaceleração mais eficaz, ou mesmo ao término, de algumas reações de degradação mediadas por microorganismos e enzimas endógenas.

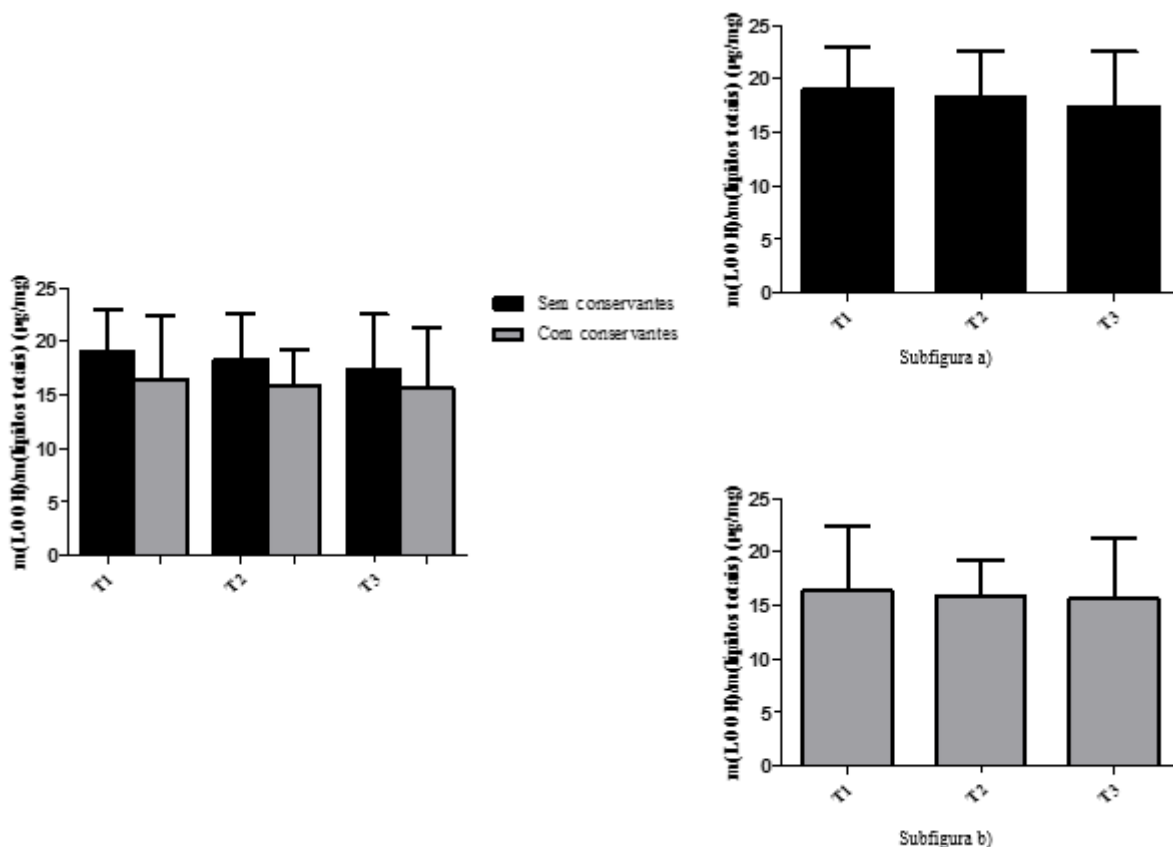


Figura 8. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sujeito a congelação (-18°C). Quantidade de hidroperóxidos lipídicos (LOOH, µg) por cada mg de lípidos totais presente no extrato de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso ao método de FOX II avaliou-se a formação de hidroperóxidos lipídicos em amostras sem e com conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura b): Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Nas amostras nas quais houve a adição de conservantes (Figura 8, Subfigura b)), verifica-se igualmente uma estabilização da concentração de hidroperóxidos – cerca de 15,4 µg/mg de lípidos totais. De facto, em ambos os casos se verifica que a adição de conservantes parece ter um efeito determinante na inibição da peroxidação lipídica (Figura 9). A combinação de congelação com a adição de conservantes conduziu ao menor valor de quantidade de hidroperóxidos observados neste estudo, demonstrando um efeito

sinérgico e benéfico entre a congelação a a adição de conservantes no que diz respeito à desaceleração das reações de degradação. Este efeito sinérgico tira proveito da capacidade protetora dos conservantes usados, fruto das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas intrínsecas.

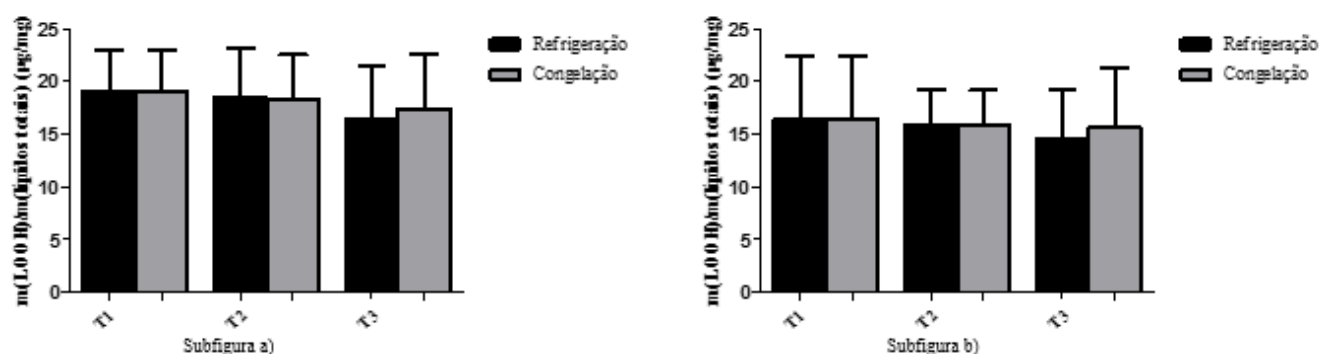


Figura 9. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C). Quantidade de hidroperóxidos lipídicos (LOOH, μg) por cada mg de lípidos totais presente no extrato de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso ao método de FOX II avaliou-se a formação de hidroperóxidos lipídicos em amostras sem e com conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).

Subfigura b): Quantificação de hidroperóxidos lipídicos de PhytoBloom Green Formula® com conservantes refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).

Os resultados acima descritos apontam assim para o potencial do uso de conservantes aliado à congelação em produtos como PhytoBloom Green Formula®, cuja validade é de cerca de 4 semanas. Sendo que um dos parâmetros para a seleção das algas, e seus produtos derivados, a usar em aquacultura se prende com o perfil de ácidos gordos, em particular com o seu teor em PUFA ómega 3, a relativa estabilidade deste conferida pela combinação da adição de conservantes e congelação torna-se vantajosa do ponto de vista do consumidor, que adquire um produto cuja qualidade nutricional se mantém por um período superior ao dos restantes produtos comercializados para aquaculture, bem como do ponto de vista dos produtores de algas, visto que permite a exportação do produto sem que este chegue ao destino com uma validade muito reduzida ou mesmo nula.

Os resultados obtidos pelo método de FOX II são contrastantes com os resultados observados na quantificação de ácidos gordos por GC-FID, descrita na secção 4.2. A quantificação dos ácidos gordos indica que não há variações significativas nas amostras refrigeradas e congeladas ao longo do tempo e que a adição de conservantes não exerce influência no perfil de ácidos gordos de PhytoBloom Green Formula®. No entanto, os resultados obtidos pelo método de FOX II indicam que a adição de conservantes conduz a um grau de peroxidação menor, observando uma concentração de hidroperóxidos lipídicos inferior nas amostras nas quais houve adição de conservantes.

O empacotamento dos ácidos gordos poli-insaturados (PUFA) nas membranas dos cloroplastos favorece a iniciação das reações em cadeia envolvidas na peroxidação lipídica, sendo esta a classe de ácidos gordos a mais afetada neste processo (25). Grossi e seus colaboradores (50) verificaram este fenómeno aquando do seu estudo da biodegradação de lípidos de *Nannochloropsis salina*. Ao fim de 442 dias de incubação, observaram 89% de degradação de ácidos gordos poli-insaturados (PUFA), contrastando (MUFA), com 63% e 67% no que é respeitante a ácidos gordos saturados (SFA) e mono-insaturados respetivamente. Este facto pode estar relacionado com a elevada presença de ligações duplas nos PUFA, sendo estas alvo de ação de várias ROS. Assim, esperava-se observar uma diminuição das abundâncias relativas destes PUFA nas análises de GC-FID. Deste modo, uma explicação possível para este fenómeno pode estar ligada com a sensibilidade do GC-FID, sendo que variações na abundância relativa dos ácidos gordos de amostras de microalgas podem não ser passíveis de serem detetadas em aparelhos como o usado neste estudo. De facto, em estudos nos quais se obteve o perfil de ácidos gordos da mesma amostra com recurso a diferentes métodos de cromatografia gasosa, incluindo amostras de microalgas, observou-se uma maior sensibilidade de um espectrómetro de massa face a um detetor de ionização por chama, especialmente no que diz respeito à separação e quantificação de FAME correspondentes a PUFA C16-C18 (51,52). Assim, a informação obtida neste trabalho deveria ser completada por uma confirmação da quantificação de ácidos gordos usando um método mais sensível, como é o caso do GC-MS.

4.4. Quantificação de pigmentos por espectrofotometria: quantificação de clorofila a e carotenóides

O facto dos pigmentos absorverem radiação visível facilita a sua análise qualitativa e quantitativa (53), sendo que a grande maioria dos estudos envolvendo a quantificação de pigmentos, em particular clorofilas e carotenóides, se realiza com recurso a métodos espectrofotométricos. No entanto, no que é respeitante aos métodos de extração destes pigmentos em algas, há uma grande variedade de métodos empregues, sobretudo solventes orgânicos. Dere e seus colaboradores (54) estudaram a influência de diferentes solventes na extração de clorofila a e carotenóides em 4 amostras de algas diferentes. Comparando éter dietílico, metanol e acetona, verificaram que em todas as algas estudadas, conseguiu-se obter a maior concentração de clorofila a quando foi usado metanol; no entanto, no que diz respeito aos carotenóides, observaram que os melhores resultados se obtinham usando acetona. Apesar do metanol ser um dos solventes adequados ao estudo de clorofilas, este solvente é tóxico, o que o torna desaconselhável para estudos de extensão do período de validade de produtos derivados de algas. Assim, o solvente usado no presente estudo foi a acetona, quer para a extração da clorofila a, quer para a extração de carotenóides. Resumidamente, às amostras das diferentes condições experimentais foi adicionada acetona 90%. Posteriormente, as amostras foram incubadas durante 1 hora à temperatura de 3°C. Terminada a incubação, foi efetuada uma centrifugação, sendo o sobrenadante recolhido e a absorvância da solução obtida lida num espectrofotómetro nos seguintes comprimentos de onda: 630, 645 e 665nm para a determinação da clorofila a e 480nm para a determinação dos carotenóides.

4.4.1. Quantificação de clorofila a

A degradação das clorofilas, que ocorre sobretudo como consequência de reações oxidativas, tem como resultado a formação de compostos intermédios como a feofitina, o feoforbídeo e a clorofilida, todos pigmentos de cor acastanhada (1,14,47). Esta alteração de cor em produtos derivados de algas, dos quais o PhytoBloom Green Formula® usado neste estudo é exemplo, pode levar à diminuição do seu valor comercial. No contexto deste estudo, as características organoléticas das amostras são relevantes, pelo que a verificação

da ocorrência de alteração da cor das amostras e a investigação das suas causas e modos de prevenção são de extrema importância.

É possível observar que nas amostras refrigeradas sem conservantes (Figura 10, Subfigura a)) o teor de clorofila a não sofreu variações nos dois primeiros pontos temporais. No entanto, no terceiro momento temporal (T3), verificou-se uma diminuição significativa do teor de clorofila a face ao valor observado no momento inicial, já que a concentração de clorofila a era de 64,6 µg/mL de amostra. Os resultados obtidos demonstram que o armazenamento a baixas temperaturas (0-5°C) pode influenciar o teor de clorofila a em concentrados de *Nannochloropsis sp.*, embora a variação observada não seja estatisticamente significativa. Estes resultados não eram esperáveis, já que os fatores que exercem maior influência na concentração de clorofilas em algas são a disponibilidade limitada ou mesmo a depleção de nutrientes, nomeadamente o azoto e o ferro, que induzem fenómenos de clorose e diminuição de fotossíntese (27,28), bem como fenómenos de foto-oxidação, que promovem a degradação oxidativa das clorofilas (1,47).

Nas amostras nas quais houve adição de conservantes (Figura 10, Subfigura b)) é possível observar uma estabilização da concentração de clorofila a – aproximadamente 67,9µg/mL de amostra – sem variações significativas. É possível observar a possível influência da adição de conservantes no último ponto temporal (T3), quando se compara a concentração das amostras sem conservantes e as amostras com conservantes, observando-se diferenças significativas (Figura 8). Uma vez que as amostras de ambas as condições foram cultivadas no mesmo meio e foram ambas armazenadas no escuro, esta diferença é possivelmente fruto da adição de conservantes, mais especificamente a adição de 3 aditivos alimentares com propriedades antioxidantes que possam ter desacelerado a formação de ROS em PhytoBloom Green Formula®.

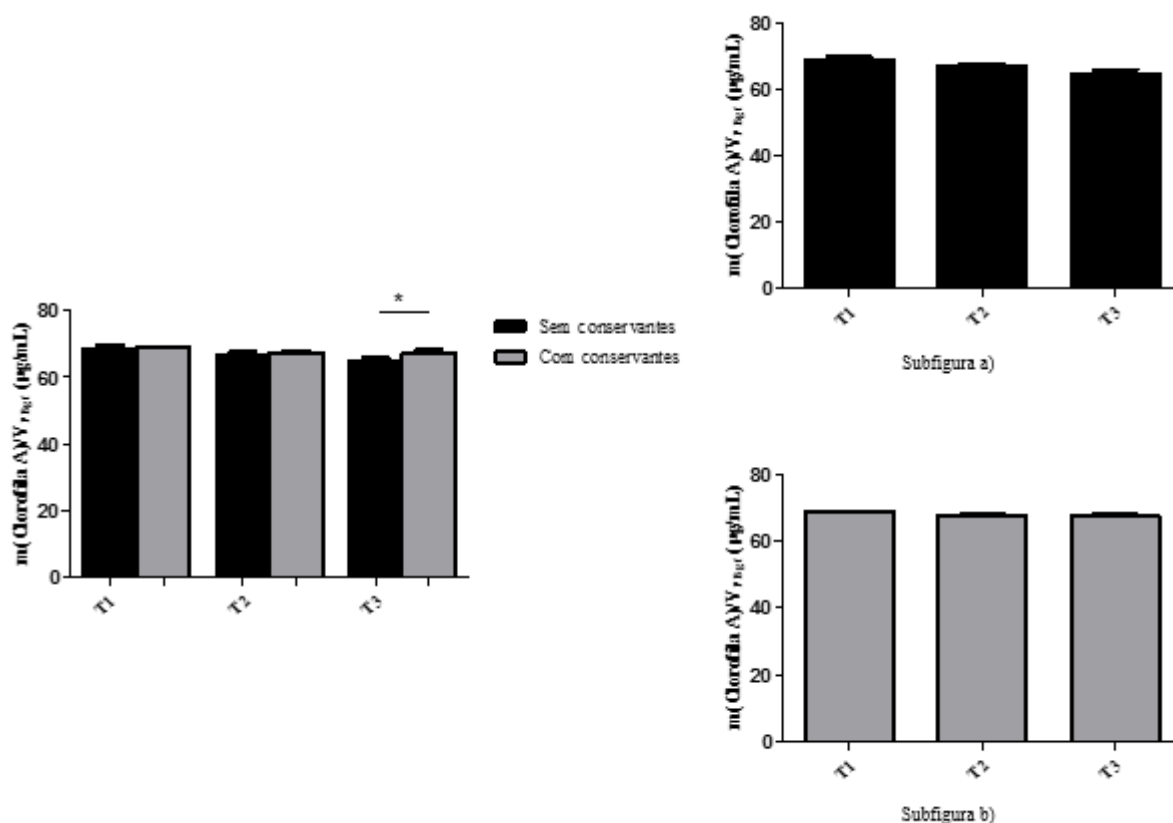


Figura 10. Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C). Quantidade de clorofila a (µg) presente nos extratos de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso a espectrofotometria, determinou-se a concentração de clorofila a de amostras sem conservantes e com conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média \pm desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). * $p < 0.05$ Sem conservantes *versus* Com conservantes

Subfigura a): Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura b): Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Nas amostras congeladas (Figura 11), observou-se uma estabilização da concentração de clorofila a, quer nas amostras sem conservantes (Figura 11, Subfigura a)), quer nas amostras com conservantes (Figura 11, Subfigura b)), o que permite inferir que a congelação exerce um efeito superior ao da refrigeração. No que é respeitante às amostras sem conservantes (Figura 11, Subfigura a)), a concentração de clorofila a permaneceu na ordem dos 67,9 µg/mL de amostra. Contudo, os melhores resultados foram obtidos com a combinação entre congelação e adição de conservantes (Figura 11, Subfigura b)), com os

quais se observou uma estabilização da concentração de clorofila a - aproximadamente 68,4µ/mL.

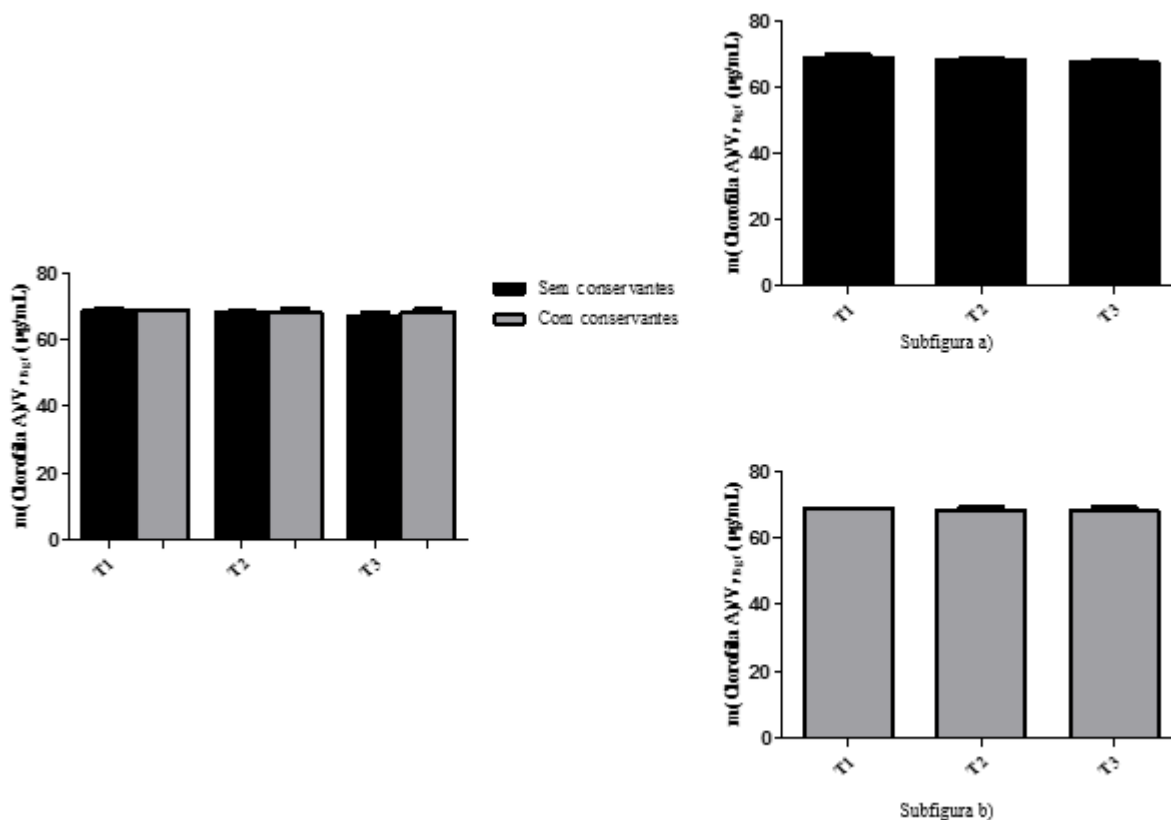


Figura 11. Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sujeito a congelação (-18°C). Quantidade de clorofila a (µg) presente nos extratos de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso a espectrofotometria, determinou-se a concentração de clorofila a de amostras sem conservantes e com conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura b): Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Efetivamente, a congelação parece conduzir a uma estabilização do teor de clorofila a, mesmo sem a adição de conservantes, fenómeno que não se observa nas amostras refrigeradas sem conservantes, havendo diferenças significativas entre as amostras das duas condições no último ponto temporal (T3) (Figura 12). No entanto, a adição de conservantes conduz a um menor grau de degradação de clorofila a, já que a concentração desta foi superior das amostras congeladas nas quais houve adição de conservantes. Estes

resultados podem ser consequência da ação dos aditivos com propriedades antioxidantes sobre as ROS que são naturalmente formadas nos cloroplastos fruto de reações associadas ao processo fotossintético.

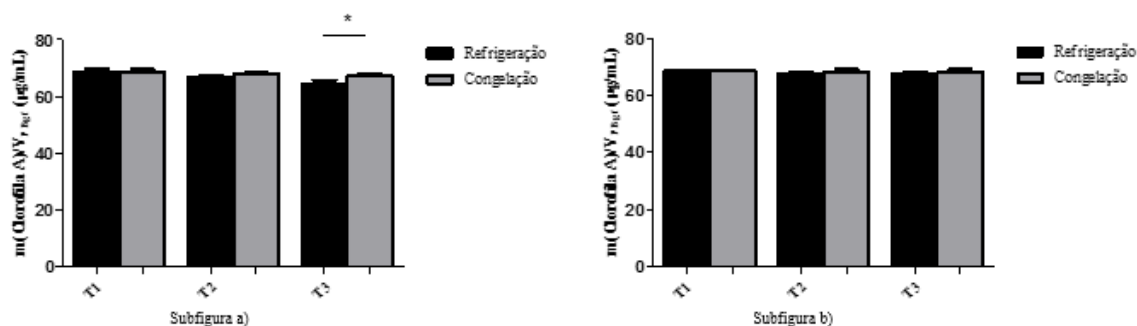


Figura 12. Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C). Quantidade de clorofila a (µg) presente nos extratos de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso a espectrofotometria, determinou-se a concentração de clorofila a de amostras sem conservantes e com conservantes correspondentes a três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3). * $p < 0.05$ Refrigeração *versus* Congelação

Subfigura a): Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).

Subfigura b): Quantificação de clorofila a de PhytoBloom Green Formula® com conservantes refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).

4.4.2. Quantificação de carotenóides

A quantificação de carotenóides foi também efetuada por espectrofotometria. É possível observar nas amostras refrigeradas (Figura 13) uma diminuição de cerca de 11% entre o primeiro (T1) e o último (T3) ponto temporal nas amostras sem conservantes, (Figura 13, Subfigura a)), embora esta diminuição não seja estatisticamente significativa. Curiosamente, esta diminuição do teor de carotenóides não se observa nas amostras com conservantes (Figura 13, Subfigura b)), nas quais a concentração de carotenóides se manteve na ordem dos 22,9 µg/mL de amostra, sem variações significativas. Estes resultados reforçam a ideia de que a adição de conservantes (aditivos alimentares) tem um efeito protetor nos pigmentos, visto que a adição de conservantes também promoveu a estabilização da concentração de clorofila a. Dado que os carotenóides são moléculas relativamente instáveis e a sua degradação é, essencialmente, oxidativa, bem como no caso

da clorofila a (26), os aditivos alimentares com propriedades antioxidantes que foram adicionados serão os principais responsáveis por esta estabilização.

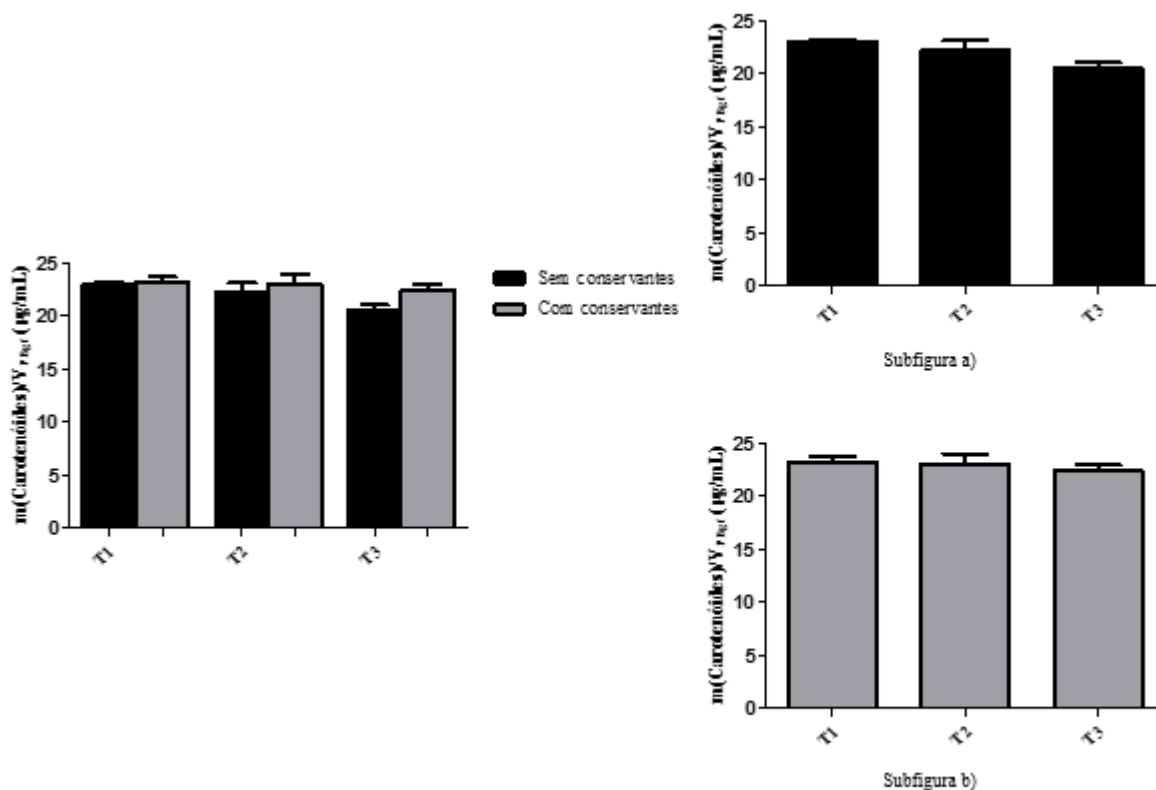


Figura 13. Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C). Quantidade de carotenóides (µg) presente nos extratos de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso a espectrofotometria, determinou-se a concentração de carotenóides de amostras sem conservantes e com conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura b): Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a refrigeração (0-5°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Nas amostras congeladas (Figura 14) observa-se uma estabilização da concentração de carotenóides, quer nas amostras sem conservantes (Figura 14, Subfigura a)), quer nas amostras com conservantes (Figura 14, Subfigura b)), fenómeno igualmente observado na determinação do teor de clorofila a. No entanto, a concentração de carotenóides mais elevada foi obtida com o uso combinado de congelamento e adição de conservantes – cerca de 23 µg/mL de amostra, o que demonstra que, embora a congelamento

parece exercer algum efeito da desaceleração da degradação dos carotenóides, a adição de conservantes conduz a maior preservação dos carotenóides.

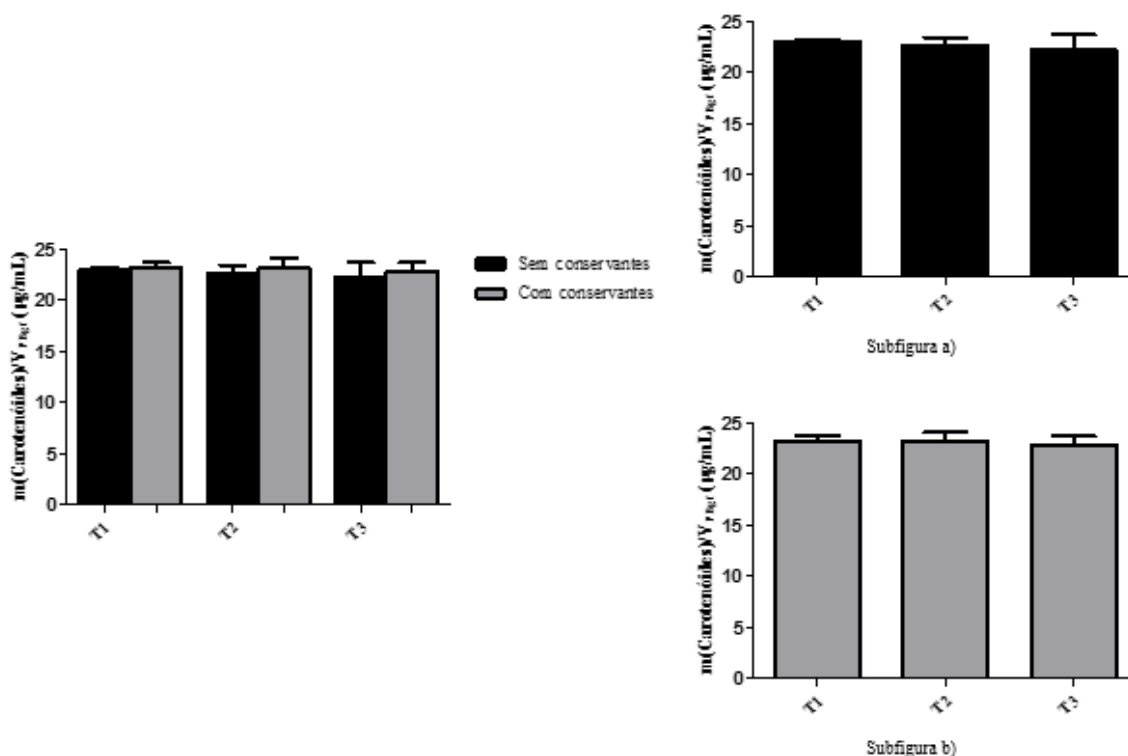


Figura 14. Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sujeito a congelação (-18°C). Quantidade de carotenóides (µg) presente nos extratos de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso a espectrofotometria, determinou-se a concentração de carotenóides de amostras sem conservantes e com conservantes em três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Subfigura b): Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® com conservantes sujeito a congelação (-18°C) em três pontos temporais (T1, T2 e T3).

Estes resultados são contrastantes com os obtidos por Gouveia e seus colaboradores (26), cujo estudo se focou na influência de diferentes condições de armazenamento no teor de carotenóides da biomassa de 4 microalgas. Observou-se que a congelação a -18°C exercia uma influência ligeiramente superior que a adição de 0,01% de ácido ascórbico, observando uma maior diminuição da concentração de carotenóides no ensaio com a adição de ácido ascórbico. O facto da congelação exercer um efeito protetor superior ao de um aditivo com propriedades antioxidantes pode ser explicado pelo facto do ensaio no qual

houve adição de ácido ascórbico ter sido efetuado à temperatura ambiente, o que por si só pode ter conduzido a uma degradação da amostra e, conseqüentemente, à diferença observada. No entanto, no presente estudo foi usada uma combinação de diferentes aditivos alimentares, com propriedades variadas que por ação conjunta e sinérgica, exercem uma função conservante superior à conferida pela adição de um único aditivo com funções essencialmente antioxidantes.

Comparando a refrigeração e a congelação (Figura 15), é possível observar que a adição de conservantes conduz a uma estabilização do teor de carotenóides em ambas as condições. Ainda assim, o teor de carotenóides das amostras congeladas foi superior, pelo que o método que apresenta resultados mais promissores no que é respeitante à estabilização da concentração de carotenóides é a combinação de congelação com a adição de conservantes.

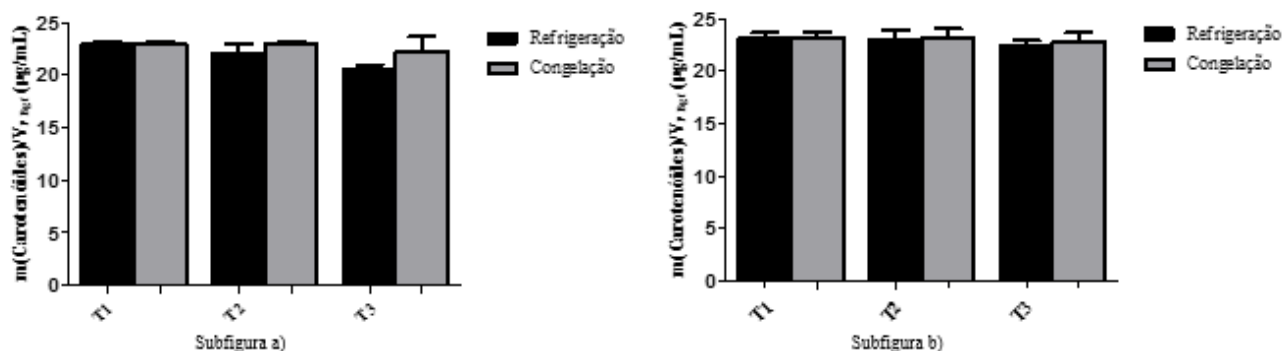


Figura 15. Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sujeito a refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C). Quantidade de carotenóides (µg) presente nos extratos de PhytoBloom Green Formula®. Por recurso a espectrofotometria, determinou-se a concentração de carotenóides de amostras sem conservantes e com conservantes correspondents a três pontos temporais (T1, T2 e T3). Os resultados encontram-se representados em termos de média ± desvio padrão de três amostras biológicas independentes (N=3).

Subfigura a): Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® sem conservantes refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).

Subfigura b): Quantificação de carotenóides de PhytoBloom Green Formula® com conservantes refrigeração (0-5°C) ou congelação (-18°C).

A importância da estabilização do teor de carotenóides está associada sobretudo ao valor nutricional que o PhytoBloom Green Formula® apresenta, dado que os carotenóides

têm uma elevada capacidade antioxidante e a sua perda pode ter consequências nos animais marinhos que são alimentados com este produto, no que diz respeito à sua resistência a *stress* oxidativo e mesmo algumas doenças (1). Por outro lado, a pigmentação e coloração de alguns animais marinhos criados em aquacultura está também associada ao teor de carotenóides das algas que lhes servem de fonte de alimentação, uma vez que a alteração ou mesmo perda da sua cor característica pode ter fortes implicações no seu valor comercial.

5. Conclusões e Diretrizes Futuras

Este trabalho tinha como objetivos principais testar diferentes métodos de conservação de PhytoBloom Green Formula® para aumentar o seu tempo de prateleira, determinar as alterações bioquímicas que ocorrem neste produto ao longo do seu período de validade e otimizar os métodos de conservação do concentrado de microalgas referido, com vista à extensão do seu período de validade. Os resultados alcançados evidenciaram a influência dos métodos de conservação usados, sendo esta mais evidente nos seguintes parâmetros:

- Estabilização da concentração de hidroperóxidos lipídicos nas amostras sujeitas à combinação de congelação e adição de conservantes, e logo, desaceleração das reações de peroxidação lipídica;
- Estabilização da concentração de clorofila a nas amostras sujeitas a congelação, obtendo-se o valor de concentração mais elevado nas amostras sujeitas a congelação e adição de conservantes;
- Estabilização da concentração de carotenóides nas amostras sujeitas a congelação, obtendo-se o valor de concentração mais elevado nas amostras sujeitas a congelação e adição de conservantes.

De modo geral, os parâmetros avaliados indicam que o melhor método de conservação de PhytoBloom Green Formula® envolve a congelação e adição de conservantes, dado que quando nas amostras onde estes foram empregues se obteve um menor grau de peroxidação lipídica e uma manutenção das concentrações dos pigmentos avaliados nos três pontos temporais. Com o presente trabalho foi possível demonstrar a aplicabilidade da adição de conservantes, no que é respeitante à preservação da qualidade nutricional de um concentrado de *Nannochloropsis sp.*

O desenho do plano experimental foi elaborado no sentido de permitir observar em cada ponto temporal alterações bioquímicas e organoléticas do produto, desde o momento em que foram preparadas as soluções de PhytoBloom Green Formula® sem e com conservantes, sob exposição a diferentes métodos de conservação. Este trabalho é pioneiro no que toca a concentrados de microalgas, já que não só envolve o estudo do impacto da refrigeração e congelação em concentrados de microalgas, mas igualmente a sua combinação com uma mistura de aditivos alimentares e pela primeira vez é feita uma avaliação bioquímica ao longo do ensaio, pelo que outros estudos que pudessem ser usados como base eram escassos. Deste modo, sugerem-se algumas diretrizes para futuros

trabalhos, notavelmente a alteração do modo de recolha das alíquotas, com vista a diminuir a influência de fatores externos nos resultados obtidos. A recolha das alíquotas no 3º ponto temporal foi efetuada no Departamento de Química da Universidade de Aveiro e não na empresa Necton S.A., como as duas recolhas anteriores. Para tal, as amostras de 150mL foram transportadas da Necton S.A. para a Universidade de Aveiro, facto estes que conduz imediatamente a dois problemas. O primeiro está relacionado com o facto das amostras terem sido transportadas durante 4/5 horas em caixas que não mimetizam os ambientes de refrigeração e congelação gerados pelos aparelhos onde estavam as amostras, como também não garantem estas condições a 100%. O segundo problema reside no facto da recolha das alíquotas no 3º momento ter sido feita num local diferente de onde foram feitas as duas recolhas anteriores, o que implica que após o transporte, as amostras estiveram em aparelhos (frigorífico e arca congeladora) diferentes dos iniciais.

Outro parâmetro relacionado com o desenho experimental deste trabalho que pode ter influenciado os resultados obtidos prende-se com a congelação das alíquotas. Após a recolha das alíquotas nos diferentes momentos, estas foram congeladas a -18°C , no sentido de impedir que as reações de degradação progredissem e assim obter resultados correspondentes a cada ponto temporal. Sendo um dos métodos de conservação estudados precisamente a congelação a -18°C , os dados obtidos para as amostras refrigeradas, são na realidade consequência duma combinação entre refrigeração seguida de congelação, pelo que não houve uma diferença precisa entre a refrigeração e a congelação.

Por último, o desfasamento entre a recolha das amostras e a sua análise conduziu a resultados que não correspondem a uma evolução desde o momento inicial até dois meses de exposição aos diferentes métodos, mas sim a uma evolução ao fim de 4, 5 e 6 meses sob as diferentes condições. Este desfasamento pode-se traduzir numa degradação avançada das amostras quando analisadas o que impede a observação do efeito real dos métodos aplicados, e conseqüentemente, a concretização verdadeira do objetivo proposto para este trabalho.

Assim, como melhoramento deste plano experimental e uso como guia na elaboração de planos experimentais futuros, propõem-se algumas alterações. No sentido de se observarem claramente as alterações correspondentes a cada ponto temporal, as análises a serem realizadas devem-se efectuar no ponto temporal correspondente, isto é, se pretendem realizar análises a um produto passados dois meses de refrigeração/congelação,

estas devem ser efetuadas no dia em que se perfazem os dois meses, preferencialmente; caso contrário, efetuar as análises num curto intervalo de tempo depois - poucos dias. Adaptando estas sugestões às condições laboratoriais da Necton S.A., a análise bioquímica das amostras deve ser feitas em instalações equipadas para o fazer num curto intervalo de tempo. Estas sugestões permitem não só a eliminação do desfasamento prolongado até a realização das análises, bem como a congelação das amostras após a sua recolha tornar-se desnecessária. Análises que possam ser efetuadas nas instalações da empresa prendem-se com uma avaliação sensorial e, no caso de parâmetros bioquímicos, a realização de um ensaio de FOX II. Esta análise é redutora, quando se pretende avaliar alterações do perfil bioquímico; no entanto, os lípidos são das primeiras biomoléculas a sofrerem degradação, por serem alvo preferencial de diferentes agentes de degradação, como as ROS. Assim, uma quantificação dos hidroperóxidos lipídicos que estão a ser formados nas amostras permite ter uma noção geral do grau de degradação de cada amostra.

Sendo este um tema pouco explorado na atualidade os resultados alcançados poderão contribuir para a elucidação do papel das condições de armazenamento na alterações de parâmetros bioquímicos e organolépticos de concentrados de *Nannochloropsis sp.* e oferecer um ponto de partida para futuros estudos no contexto da preservação e extensão do tempo de prateleira de concentrados e pastas de microalgas. Apesar dos resultados não demonstrarem a evolução temporal dos parâmetros avaliados, e assim inferir a possibilidade de aumentar a validade dos concentrados referidos, a avaliação dos parâmetros em três pontos temporais distintos permite observar a influência dos métodos de conservação empregues, podendo estes resultados ser usados futuramente como base de estudos sobre a influência de adição de aditivos alimentares na conservação de concentrados e pastas de microalgas.

6. Bibliografia

5. Bibliografia

1. Richmond A, editor. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. 1st Ed. Blackweel Science Ltd; 2004.
2. Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. A Look Back at the U . S . Department of Energy ' s Aquatic Species Program : Biodiesel from Algae. 1998.
3. Rivero-Rodríguez S, Beaumont AR, Lora-Vilchis MC. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture*. 2007;263(1-4):199–210.
4. Rodolfi L, Zittelli GC, Barsanti L, Rosati G, Tredici MR. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomol Eng*. 2003;20(4-6):243–8.
5. Correia CR. Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas marinhas. Instituto Politécnico de Leiria; 2013.
6. Hu H, Gao K. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton , *Nannochloropsis* sp ., with enriched carbon sources. *Biotechnol Lett*. 2003;25:421–5.
7. Olofsson M, Lamela T, Nilsson E, Bergé JP, del Pino V, Uronen P, Legrand C. Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors. *Energies*. 2012;5(12):1577–92.
8. Sánchez S, Mart E, Espinola F. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochem Eng J*. 2000;6 (1):13–8.
9. Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 1997;151 (1-4):315–31.
10. Renaud SM, Thinh L, Parry DL. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*. 1999;170(2):147–59.
11. Renaud SM, Thinh L, Lambrinidis G, Parry DL. Effect of temperature on growth , chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. 2002;211(1-4):195–214.
12. Fábregas, J, Maseda A, Domı A, Otero A. The cell composition of *Nannochloropsis* sp . changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World J Microbiol Biotechnol*. 2004;20(1):31–5.
13. Welladsen H, Kent M, Mangott A, Li Y. Shelf-life assessment of microalgae concentrates: Effect of cold preservation on microalgal nutrition profiles. *Aquaculture*. 2014;430:241–7.

Bibliografia

14. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. W. H. Freeman; 2004.
15. Nakamura Y, Takahashi J-I, Sakurai A, Inaba Y, Suzuki E, Nihei S, Fujiwara S, Tsuzuki M, Miyashita H, Ikemoto H, Kawachi M, Sekiguchi H, Kurano N. Some Cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type alpha-polyglucans instead of glycogen. *Plant Cell Physiol*. 2005;46(3):539–45.
16. Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Ap Energy*. 2011;88(10):3331–5.
17. Li S, Xu J, Jiang Y, Zhou C, Yu X, Zhong Y, Chen J, Yan X. Lipidomic analysis can distinguish between two morphologically similar strains of *Nannochloropsis oceanica*. *J Phycol*. 2015;51(2):264–76.
18. Lu N, Wei D, Chen F, Yang S-T. Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis* under salt stress. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2012;114(3):253–65.
19. Pal D, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(4):1429–41.
20. Seychelles LH, Audet C, Tremblay R, Fournier R, Pernet F. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Müller) using frozen-concentrated microalgae. *Aquac Nutr*. 2009;15(4):431–9.
21. Faulk CK, Holt GJ. Advances in rearing cobia *Rachycentron canadum* larvae in recirculating aquaculture systems: Live prey enrichment and greenwater culture. *Aquaculture*. 2005;249(1-4):231–43.
22. Roncarati A, Meluzzi A, Acciarri S, Tallarico N, Melotti P. Fatty Acid Composition of Different Microalgae Strains (*Nannochloropsis* sp., *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd, *Nannochloris atomus* Butcher and *Isochrysis* sp.) according to the Culture Phase and the Carbon Dioxide Concentration. *J World Aquacult Soc*. 2004;35(3):401–11.
23. Martin GJO, Hill DRA, Olmstead ILD, Bergamin A, Shears MJ, Dias DA, Kentish SE, Scales PJ, Botté CY, Callahan DL. Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *PLoS One*. 2014;9(8):1–10.
24. Olofsson M, Lamela T, Nilsson E, Bergé J-P, del Pino V, Uronen P, Legrand C. Combined effects of nitrogen concentration and seasonal changes on the production of lipids in *Nannochloropsis oculata*. *Mar Drugs*. 2014;12(4):1891–910.
25. Ledford HK, Niyogi KK. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environ*. 2005;28(8):1037–45.
26. Gouveia L, Empis J. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2003;4(2):227–33.

27. Greene RM, Geider RJ, Falkowski PG. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. *Limnol Oceanogr.* 1991;36(8):1772–82.
28. Sauer J, Schreiber U, Schmid R, Volker U, Forchhammer K. Nitrogen Starvation-Induced Chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942 . Low-Level Photosynthesis As a Mechanism of Long-Term Survival. *Plant Physiol.* 2015;126:233-43.
29. Boroda AV, Aizdaicher NA, Odintsova NA. The influence of ultra-low temperatures on marine microalgal cells. *J Appl Phycol.* 2013;26(1):387–97.
30. Zittelli GC, Lavista F, Bastianini A, Rodolfi L, Vincenzini M, Tredici MR. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp . cultures in outdoor tubular photobioreactors. *J Biotechnol.* 1999;70(1-30):299–312.
31. Cadima EL. FAO: fisheries technical paper 393. Fish Stock Assessment Manual. Rome 2003;1:66.
32. FAO global aquaculture production volume and value statistics database updated to 2012. 2014: 1-4.
33. Patil V, Källqvist T, Olsen E, Vogt G, Gislerød HR. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult Int.* 2006;15(1):1–9.
34. Abu-rezq TS, Al-musallam L, Al-shimmari J, Dias P. Optimum production conditions for different high-quality marine algae. *Hydrobiologia* 1999;(1985):97–107.
35. Rocha RJ, Ribeiro L, Costa R, Dinis MT. Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture? *Aquacult Res.* 2008;39(4):362–9.
36. Waldenstedt L, Inborr J, Hansson I, Elwinger K. Effects of astaxanthin-rich algal meal (*Haematococcus pluvalis*) on growth performance, caecal campylobacter and clostridial counts and tissue astaxanthin concentration of broiler chickens. *Ani Feed Sci Technol.* 2003;108(1-4):119–32.
37. Heasman M, Diemar J, Connor WO, Sushames T, Foulkes L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs ± a summary. *Aquacult Res.* 2000;(1989):637–59.
38. Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle P. Food Chemistry. 4th ed. Springer-Verbag Berlin Heidelberg; 2009.
39. Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Thorngate III JH, editors. Food Additives. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc; 2001.
40. Ministry for primary industries, New Zealand government. How to Determine the Shelf-life and Date Marking of Food. 2012:1-29.
41. Food and agriculture organization of the United Nations. Codex alimentarius commission. Rome, 1995:3–12.
42. Daurelio G, Comparelli R, Catalano IM, Andriani SE. Paint Ablation Process vs Different Laser Wavelengths for 18 Diverse Spray Paints used for Graffiti on the Monuments and Historical Mansions. SPIE Proceedings, Volume 7751. XVIII

Bibliografia

- International Symposium on Gas Flow, Chemical Lasers, and High-Power Lasers. Sofia 2010.
43. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Physiol.*1959;37(8):911-17.
 44. Dieffenbacher A, Pocklington WD. Standard Methods for the Analysis of Oils , Fats and Derivatives. 1st Supplement to the 7th Edition International Union of Pure and Applied Chemistry Commission on Oils, Fats and Derivatives. 1991:1-372.
 45. Jiang Z, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe²⁺ + in the Presence of Xylenol Orange . Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. *Lipids.*1991;26(10):853-6.
 46. Banse K, Anderson GC. Computations of Chlorophyll Concentrations From Spectrophotometric Readings.1996:696-7.
 47. Lorenzen CJ. Determination of Chlorophyll and Pheo-pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnol and Oceanogr.*1967;12(2):343-6.
 48. Lesser MP. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu Rev Physiol.*2006;68:253-78.
 49. Girotti AW. Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems. *J Lip Res.*1998;39(8):1529-42.
 50. Grossi V, Blokker P, Damste JSS. Anaerobic biodegradation of lipids of the marine microalga *Nannochloropsis salina*. *Org Geochem.*2001;32(6):795-808.
 51. Woo S-G, Yoo K, Lee J, Bang S, Lee M, On K, Park J. Comparison of fatty acid analysis methods for assessing biorefinery applicability of wastewater cultivated microalgae. *Talanta.* 2012;97:103-10.
 52. Young KE, Quinn SM, Trumble SJ. Comparing Gas Chromatographic Techniques Used in Fatty Acid Profiling of Northern Fur Seals (*Callorhinus ursinus*) and Steller Sea Lions (*Eumetopias jubatus*) from Lovushki Island Complex , Russia. *Int J Appl Sci Technol.* 2012;2(9):11-21.
 53. Sartory DP, Grobbelaar JU. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia.* 1984;114(3):177-87.
 54. Dere S, Gunes T, Sivaci R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A , B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Tr J Botany.*1998;22:13-7.