



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Raquel Ferreira Teixeira

DESENVOLVIMENTO DE CROUTONS COM
MICROALGA CHLORELLA VULGARIS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar
orientada pela Mestre Maria João de Barros Campos e pela
Engenheira Anabela Ferreira e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Raquel Ferreira Teixeira

DESENVOLVIMENTO DE *CROUTONS* COM
MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela
Mestre Maria João de Barros Campos e pela Engenheira Anabela Ferreira e
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2022

Agradecimentos

A realização do mestrado e a escrita da dissertação foi uma etapa desafiante na minha vida, que contou com o apoio de várias pessoas, às quais não posso deixar de agradecer.

À minha família que me apoiou e suportou em todos os momentos ao longo do mestrado, aos meus pais, irmã e avós por toda a paciência e compreensão. Ao João que me apoiou e compreendeu a minha ausência.

À Cláudia pelo incentivo, por ser responsável por este interesse na segurança alimentar e por me ter sugerido e criado a oportunidade deste estágio.

À Professora Cristina, pelo apoio e força para avançar para este mestrado. Ao professor Bruno pela ajuda incansável.

Às minhas colegas e amigas de mestrado Ana, Marta e Sara, companheiras de todas as horas, que partilharam angústias, alegrias e muita motivação.

À Rialto, na pessoa da D. Fátima e do Sr. José, que me deram a oportunidade de realizar este trabalho, sempre com abertura e com o espírito empreendedor próprio desta empresa.

À Anabela pelo acolhimento, paciência e compreensão ao longo dos meses. Pela orientação indispensável e decisiva em todas as etapas e pelo exemplo de trabalho nesta empresa.

Aos meus jovens colegas e amigos de estágio, a Beatriz e o André, que me fizeram companhia ao longo destes meses e tornaram esta experiência muito agradável. Por toda a disponibilidade, ensinamentos e ajuda que me ofereceram, por todas as conversas e partilhas de sorrisos e histórias. Sem dúvida que tornaram esta experiência tão enriquecedora quanto animada.

A todos os colaboradores da Rialto, pela simpatia e acolhimento, em especial aqueles que me ajudaram a desenvolver o trabalho e se disponibilizaram para apoiar e provar todas as experiências, a Ana Sofia, a Gisela, a Isaura, a Cláudia, a D. Teresa, o Sr. João, o Tiago, o Yuri e a Susana.

Aos meus amigos que sempre se mostraram interessados e entusiasmados com o meu percurso.

À minha orientadora, Professora Maria João Campos, pela disponibilidade, compreensão, apoio, motivação e orientação ao longo de todo o processo de escrita da dissertação.

Resumo

Os consumidores exigem cada vez mais qualidade e segurança dos produtos que consomem. Até 2050, a população mundial deverá crescer para 9,6 bilhões e enfrentaremos desafios crescentes para garantir que as pessoas terão acesso a alimentos seguros, nutritivos e saudáveis. Face a este aumento populacional, é necessário considerar novos produtos com qualidade nutricional e simultaneamente seguros. Neste contexto, é importante salientar a relação indissociável entre o desenvolvimento de produtos alimentares e a segurança alimentar.

As microalgas são consideradas uma fonte de alimentos promissora, sobretudo pela sua riqueza em vitaminas, minerais e proteína. A proteína é um dos principais nutrientes que serão escassos no futuro, por isso são necessárias fontes e métodos de produção de proteína alternativos para atender à necessidade dos consumidores. A incorporação da biomassa de microalgas na receita de produtos alimentares tradicionais é uma tendência mundial, sendo vários os produtos já lançados no mercado alimentar em todo o mundo.

A estabilidade da espécie *Chlorella vulgaris* e o uso do processo de produção fechado permitem criar um produto padronizado, reproduzível e livre de contaminantes. O fotobiorreator é o sistema mais comum utilizado para a produção de microalgas.

Quanto à legislação, não existe regulamentação harmonizada para as microalgas na Europa.

O objetivo da presente dissertação é descrever o processo de desenvolvimento de *croutons* como boa fonte proteica, com incorporação da microalga *Chlorella vulgaris*, salientando as questões de segurança alimentar inerentes ao processo.

Foram selecionadas duas microalgas com características semelhantes, mas cor distinta: branca e *amarela*. Foram realizadas sete formulações com diferentes percentagens de incorporação das microalgas em relação à quantidade de farinha.

Foram realizadas provas organolépticas a 18 colaboradores da empresa, nas quais foi possível observar que as formulações de *Chlorella vulgaris* amarela obtiveram a melhor pontuação em todos os atributos em análise, com especial relevância atribuída à apreciação global. O sabor, o aroma, a cor e a intenção de compra foram as qualidades onde as formulações referidas mais se destacaram.

Todos os resultados nas análises microbiológicas estavam adequados, com base na legislação existente. Também através da análise nutricional, a formulação H8%, pode incluir várias alegações nutricionais no rótulo, tais como: fonte de fibra e fonte de proteína.

Concluindo, foi possível inovar e criar um produto alimentar diferenciado, com as características nutricionais e microbiológicas desejadas, com a perspectiva de que no futuro a microalga *Chlorella vulgaris* seja incorporada em vários produtos alimentares.

Palavras-chave: segurança alimentar, microalgas, *Chlorella vulgaris*, croutons

Abstract

Nowadays consumers are expecting quality and safety from the food they buy.

By 2050, there will be 9.6 billion people on the planet, and providing them with access to safe food and good meals become more and more difficult. Considering the population growth, new goods that are both safe and nutritional must be taken into consideration. In this context, it is critical to emphasize the close connection between food safety and food product development.

Microalgae are a promising food source, particularly for their nutritional richness. Several foods have already been introduced in the global food industry that incorporate microalgae biomass into the recipe of traditional food products.

Chlorella vulgaris provides a stable and closed manufacturing method for a contaminant-free production process. The most popular system is the photobioreactor.

In terms of legislation, Europe lacks a unified microalgae regulatory framework.

The objective of this dissertation is to detail the method of *Chlorella vulgaris* incorporation into *croutons* to provide a good source of protein while exposing the procedural risks inherent to food safety.

Microalgae with similar characteristics, but different color: white and yellow, were selected. Seven formulas were presented with different percentages of the microalgae in relation to the amount of flour. Eighteen organoleptic tests were presented in which it was possible to observe the yellow *Chlorella* formulas that obtained the best evaluation in all the common attributes with which they were specially attributed to the global evaluation. Flavour, aroma, colour, and purchase intention were the attributes with which the aforementioned formulas stood out the most.

All results in the microbiological analyzes were adequate, based on existing legislation. Also, through nutritional analysis, the H8% formula can include various nutrition claims on the label, such as fiber and protein sources.

To conclude, it was possible to innovate and create a different product, with the desired nutritional and microbiological characteristics, with the prospect that in the future the microalgae *Chlorella vulgaris* will be incorporated into various products.

Keywords: food safety, microalgae, *Chlorella vulgaris*, *croutons*

Índice

| | |
|--|-----|
| Agradecimentos | III |
| Resumo | IV |
| Abstract | VI |
| Índice | VII |
| Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos..... | IX |
| 1. Introdução..... | I |
| 2. Enquadramento teórico | 4 |
| 2.1. Apresentação da empresa..... | 4 |
| 2.2. Planeamento do desenvolvimento | 5 |
| 2.3. Pesquisa bibliográfica..... | 6 |
| 3. Microalgas..... | 7 |
| 3.1. Microalgas na alimentação..... | 7 |
| 3.1.1. Melhoria da composição nutricional | 9 |
| 3.1.2. Efeitos na saúde..... | 9 |
| 3.1.3. Características reológicas e organoléticas..... | 11 |
| 4. <i>Chlorella vulgaris</i> | 12 |
| 4.1. Honey <i>Chlorella vulgaris</i> e White <i>Chlorella vulgaris</i> | 13 |
| 4.2. Incorporação da <i>Chlorella vulgaris</i> em produtos alimentares..... | 15 |
| 4.2.1. Melhoria da composição nutricional | 15 |
| 4.2.2. Efeitos na saúde..... | 16 |
| 4.2.3. Características reológicas e organoléticas..... | 17 |
| 4.2.4. Alegações nutricionais e composição nutricional..... | 18 |
| 4.3. Produção da <i>Chlorella vulgaris</i> | 18 |
| 4.3.1. Sistemas abertos | 19 |
| 4.3.2. Sistemas fechados | 20 |
| 5. Legislação..... | 22 |
| 6. Segurança alimentar | 23 |

| | | |
|--------|--|----|
| 6.1. | Alergénios..... | 26 |
| 6.2. | Microorganismos e Contaminação | 28 |
| 6.3. | IFS Food - International Featured Standards | 30 |
| 6.3.1. | Plano HACCP..... | 30 |
| 6.3.2. | <i>Food fraud</i> e <i>food defense</i> | 32 |
| 7. | Materiais e Métodos | 34 |
| 7.1. | Matérias-primas e máquinas..... | 34 |
| 7.2. | Formulações | 34 |
| 7.3. | Métodos | 36 |
| 7.4. | Prova organolética..... | 39 |
| 7.5. | Análise microbiológica..... | 41 |
| 7.6. | Análise nutricional e alegações nutricionais..... | 45 |
| 7.7. | Análise estatística..... | 45 |
| 7.8. | Procedimentos de Segurança Alimentar..... | 46 |
| 8. | Resultados e discussão | 46 |
| 8.1. | Formulações..... | 46 |
| 8.2. | Prova organolética..... | 47 |
| 8.3. | Análise microbiológica..... | 50 |
| 8.4. | Análise nutricional e alegações nutricionais..... | 51 |
| 9. | Análise crítica e perspectivas futuras | 54 |
| 10. | Conclusão | 57 |
| 11. | Referências bibliográficas..... | 58 |
| 12. | Anexos..... | 69 |
| | Anexo A – Declaração de alérgenos Allmicoralgae®..... | 69 |
| | Anexo B – Ficha da prova organolética | 70 |
| | Anexo C – Ficha técnica <i>Croutons Chlorella vulgaris</i> | 71 |

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

Aw – Atividade da água

C.vulgaris – *Chlorella vulgaris*

DHA – Ácido gordo Docosahexaenóico

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EPA – Ácido gordo Eicosapentaenóico

FBRs – Fotobiorreatores

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point

HC – Hidratos de Carbono

IFS – International Featured Standards

OMS – Organização Mundial da Saúde

PC – Ponto de Controlo

PCC – Ponto Crítico de Controlo

SO₂ – Dióxido de enxofre

UE – União Europeia

I. Introdução

Durante vários séculos, os alimentos foram principalmente produzidos e consumidos localmente, passando nas últimas décadas a serem cada vez mais produzidos e comercializados globalmente. A procura global por alimentos de alta qualidade, disponíveis a qualquer hora e ao mesmo tempo acessíveis para a maioria dos consumidores em todo o mundo, levou a que hoje as cadeias de produtos alimentares processassem matérias-primas e produtos de todas os continentes. Com estes desenvolvimentos surgiram os fluxos e as cadeias globais de alimentos que abrangem as regiões agrícolas em todo o mundo.(1)

A cada dia surgem produtos alimentares novos, das mais diversas indústrias do ramo alimentar. Atualmente, os consumidores estão a exigir produtos alimentares sofisticados, inovadores e saudáveis. O número destes consumidores cresce diariamente, pois existe uma consciência coletiva para uma vida onde predomine a saúde e o bem-estar, através do consumo de produtos naturais.(2) Com efeito, nos últimos anos, tem havido bastante pressão para que os alimentos formulados pela indústria alimentar sejam ainda mais nutritivos.(2,3) Os consumidores exigem qualidade e segurança dos produtos que consomem, pois, os alimentos são fonte de energia e nutrientes necessários para manter uma vida saudável.(4) Procuram ainda alimentos produzidos e processados de forma sustentável, considerados seguros, frescos, naturais e com elevado valor nutricional, diminuindo ou até eliminando os aditivos sintéticos (5), obtendo assim alimentos com um “rótulo limpo”.(6–8) Neste sentido, a indústria alimentar está a ser chamada a corresponder às exigências dos consumidores, que continuarão a procurar a satisfação sensorial de todos os tipos de alimentos.

Como consequência, as empresas são movidas para a inovação e desenvolvimento de novos produtos sendo este um processo dispendioso e árduo.(5)

As recentes tendências de consumo resultam em novos produtos sem conservantes, com baixo teor de gordura e calorias reduzidas, no entanto, a modificação da formulação de um produto também pode influenciar as suas características intrínsecas como a atividade da água (aw) ou o pH para níveis propícios ao crescimento de microrganismos patogénicos de origem alimentar. Esses novos produtos devem ser simultaneamente seguros, e a sua segurança deve ser avaliada individualmente.(9)

Neste contexto, é importante salientar a relação indissociável entre o desenvolvimento de produtos alimentares e a segurança alimentar. Como as cadeias de fornecimento de alimentos atravessam várias fronteiras nacionais e regionais, a colaboração entre governos, produtores, fornecedores, distribuidores e consumidores garantirá a segurança alimentar no século XXI.

(4)

Até 2050, a população mundial deverá crescer para 9,6 bilhões e enfrentaremos desafios crescentes para garantir que as pessoas terão acesso a alimentos seguros, nutritivos e saudáveis.(10,11) A globalização e o fácil acesso a viagens rápidas fizeram das doenças transfronteiriças uma preocupação principal para a segurança alimentar.(11)

Milhões de pessoas em todo o mundo estão em risco de ingerir alimentos inseguros e ficarem doentes enquanto centenas de milhares morrem todos os anos porque consomem alimentos contaminados. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma doença de origem alimentar é uma doença de natureza infecciosa ou tóxica causada pela ingestão de alimentos ou água contaminados com bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas.(12)

Por um lado, a alimentação segura melhora a saúde individual e da população, e por outro, melhora o crescimento económico da região onde a segurança alimentar é praticada e aprimorada.(4)

Esta tendência de aumento da procura por alimentos saudáveis convergiu em alimentos distintos, entre eles as algas. Estas tornaram-se uma nova e importante fonte de ingredientes e compostos naturais.(13) As algas, incluindo microalgas e algas marinhas, têm na verdade uma longa história de uso e aplicações. Foram sendo cada vez mais importantes como ingredientes alimentares e aditivos na ração animal, mas também como constituintes de cosméticos, agroquímicos, biomateriais e como matérias-primas de energia renovável embora também possam ser utilizadas para serviços como tratamento de águas residuais e limpeza de gases de combustão ou outros usos ambientais como, por exemplo, produção de bioplástico, biorremediação de resíduos alimentares, biocombustível, monitorização ambiental e produção de biohidrogénio e biogás.(3,14–23) Esta ampla utilização deve-se ao crescente conhecimento sobre os valiosos compostos funcionais que as microalgas possuem e os benefícios que elas podem oferecer em termos de sustentabilidade em comparação com os métodos atuais de produção de alimentos ou energia.(19) Têm na realidade muitos usos e podem servir a uma ampla gama de indústrias, tornando-se um recurso altamente valioso.

Assim, as microalgas podem contribuir ainda mais para a economia, aumentando a capacidade de produção atual e desenvolvendo novas aplicações. Existem características que favorecem o aumento da sua utilização, entre elas, o facto de serem microrganismos de crescimento rápido, serem capazes de atingir uma elevada produtividade de biomassa e utilizarem principalmente a luz solar como fonte de energia. Por esses motivos, são consideradas fundamentais para o desenvolvimento de processos sustentáveis que contribuam para a economia global.(24)

Quanto à sua utilização na alimentação, a maior parte da biomassa das microalgas atualmente comercializada para fins alimentares é vendida como suplemento alimentar em comprimidos, cápsulas ou em pó e é promovida como “superalimento”, “rico em proteínas” e/ou “rico em ômega-3”.(3,25) Nos últimos anos, a tendência tem sido incorporar a biomassa das microalgas ou compostos derivados de microalgas como ingrediente em formulações de alimentos. Estes alimentos podem ser divididos entre aqueles que usam biomassa de microalgas apenas como agente corante e aqueles que usam microalgas como ingrediente diferenciado pelas suas propriedades nutricionais ou funcionais ou como estratégia de *marketing*. Alguns dos alimentos onde já foram incluídas microalgas são por exemplo, bebidas orgânicas, *crackers*, barras de origem vegetal, biscoitos, entre outros.(26)

As microalgas foram solicitadas essencialmente com o objetivo de melhorar o conteúdo nutricional de alimentos convencionais ou suplementos alimentares, agentes prebióticos ou outras aplicações terapêuticas com efeito positivo na saúde humana.(27)

Relativamente ao consumidor, atualmente, a maioria dos produtos disponíveis que contêm microalgas estão direcionados para consumidores veganos, bem como aqueles que optam por comprar produtos orgânicos ou biológicos. Inicialmente as microalgas foram consideradas apenas como uma fonte não convencional de proteína, mas percebeu-se que a proteína não era o único argumento para promover a sua utilização como alimento ou como suplemento alimentar.(28) Na realidade, as microalgas são uma importante fonte de compostos bioativos, que podem beneficiar a saúde, pois demonstraram ter propriedades antioxidantes e antihipertensivas, para além do seu contributo nutricional na alimentação.(29)

Relativamente ao desenvolvimento de novos produtos, este é essencial para as empresas da indústria alimentar e inclui o desenho, o desenvolvimento e a otimização de diferentes formulações, bem como as técnicas de processamento. Por exemplo, o uso de processamento térmico tem uma influência decisiva na biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos presentes no alimento. É necessário realizar um trabalho de investigação detalhado focado na aplicação dos ingredientes em causa em diferentes matrizes alimentares e o impacto nas características sensoriais, físico-químicas e propriedades reológicas.(7) Todo este processo de inovação é complexo e adquire naturalmente valorização quando recebe o *input* de vários profissionais de diferentes áreas, para que o produto final vá ao encontro do que os consumidores procuram. De entre estes profissionais, os nutricionistas têm revelado as suas competências no trabalho que desenvolvem na indústria alimentar, tal como refere o artigo 5.º do Regulamento n.º 89/2022 que define o Ato do Nutricionista.(30) Nos últimos anos os nutricionistas têm desenvolvido o seu trabalho em diversas empresas da indústria alimentar

na comunicação para o consumidor, na inovação, segurança e sustentabilidade alimentar e nutricional participando na inovação e conceção/produção de novos produtos, auxiliando no marketing nutricional, elaborando informações técnico-científicas dos produtos, colaborando no desenvolvimento da rotulagem nutricional dos produtos, estruturando informações relativas à nutrição que apoiem a promoção do produto no mercado e realizando ainda o controlo de qualidade dos géneros alimentares.(30,31)

O objetivo da presente dissertação é descrever o processo de desenvolvimento de *croutons* como boa fonte proteica, com incorporação da microalga *Chlorella vulgaris*, salientando as questões de segurança alimentar inerentes ao processo.

2. Enquadramento teórico

2.1. Apresentação da empresa

A Rialto - Indústria Alimentar, Lda é uma empresa do setor da indústria panificadora, fundada em 1988. A totalidade do seu processo de fabrico decorre nas instalações da sua fábrica, localizada na Zona Industrial da Palhaça, em Oliveira do Bairro, incluindo a sede social e serviços comerciais. No seu início laborou apenas como pastelaria e padaria e, posteriormente, com o objetivo de responder a uma tendência de mercado, passou a fabricar cubos de pão tostados, designados adiante como *croutons*, tostas com sabor (Biscottinas), pão ralado e mais recentemente *snacks* de batata e milho (Crack's®) e *topping* de pedaços de pão tostado (Breadbits®). A Rialto - Indústria Alimentar, Lda oferece atualmente uma gama de produtos diversificada e de valor acrescentado. Exporta mais de 60% da sua produção, estando atualmente presente em cerca de 25 países (em 4 continentes), com a marca Rialto, mas também com marca própria dos seus clientes.

Na Política da empresa destacam-se os princípios que a representam: a satisfação do cliente, a qualidade e segurança dos produtos, a inovação e a gestão da qualidade, tanto ao nível dos produtos como dos processos de produção, focando-se sempre na melhoria contínua. Por estes motivos, a empresa possui certificação IFS (International Featured Standards) Food, desde 2014 e atualmente, já com a versão 7. Esta norma é reconhecida pela GFSI - Global Food Safety Initiative (32,33) para fins de auditoria a fabricantes de alimentos. Foi então a partir de 2014 que a segurança alimentar assumiu uma importância ainda maior na empresa com a redefinição do Sistema de Gestão de Segurança Alimentar.

A Gerência da Rialto - Indústria Alimentar, Lda assume a gestão da Qualidade como parte integrante da gestão global das atividades desenvolvidas na empresa, sendo apoiada pela

Responsável da Qualidade, que assegura a adequação e gestão operacional do Sistema de Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. O Departamento de Inovação e Desenvolvimento (I&D/CID) também assume a responsabilidade da Segurança Alimentar, especialmente nos processos de desenvolvimento de novos produtos.



Figura 1: Logótipo da Rialto - Indústria Alimentar, Lda.

2.2. Planeamento do desenvolvimento

O presente documento constitui a dissertação de mestrado realizada no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Esta foi desenvolvida ao longo do estágio realizado na empresa Rialto, entre setembro de 2021 e julho de 2022.

A escolha do tema das microalgas foi unânime por parte da estudante e dos responsáveis da empresa (administradores, responsáveis do *Marketing* e do Gabinete de Criatividade, Investigação e Desenvolvimento). O principal motivo para criar um produto com a inclusão de microalgas foi o seu interesse nutricional, nomeadamente, teor proteico e de micronutrientes. Anteriormente já teria surgido a possibilidade de incluir algas nos produtos da empresa, no entanto, foi encontrado um obstáculo que poderia provocar alterações muito significativas. O facto dessas algas conterem os alergénios de peixes e crustáceos impediu o avanço desta ideia, pois iriam surgir implicações a vários níveis, nomeadamente a obrigação da inclusão dos alergénios na rotulagem de todos os produtos e alteração dos procedimentos relativos à segurança alimentar, especificamente no plano HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) e realização de novas análises de risco. Todas as alterações teriam também consequências ao nível económico.

Contudo, sabendo que, nos últimos anos, as algas e mais especificamente as microalgas têm sido alvo de interesse para a indústria agroalimentar e são uma tendência atrativa, foi novamente levantada esta possibilidade. Após uma pesquisa de empresas portuguesas que pudessem colaborar com este projeto e com a vontade de desenvolver novos produtos com a incorporação de microalgas, houve um contacto com uma empresa que mostrou desde logo

um grande interesse em colaborar. Neste caso, foi desde logo possível confirmar que não existiria o impedimento dos alergénios, uma vez que haveria a garantia de que aquelas microalgas eram isentas de alergénios, tendo sido referido que o único alergénio presente seria o sulfito, no entanto, como metabolito das microalgas, e numa quantidade inferior à que se encontra no Regulamento UE 1169/2011.(34) Desde logo foram apresentadas diferentes possibilidades de microalgas a utilizar, no entanto, foi necessário desenvolver algumas experiências para perceber qual seria a que efetivamente seria incorporada nos novos produtos. Foi realizada uma experiência inicial com a inclusão de três microalgas, a *Spirulina platensis*, a *Chlorella vulgaris* e a *Tetraselmis chunii* numa massa de pão, o que resultou em três pães diferentes. O resultado desta experiência foi avaliado por alguns colaboradores da empresa que deram o seu contributo para a primeira decisão. De facto, a cor verde e o sabor intenso e desconhecido destas microalgas, não gerou uma opinião positiva por parte de todos os colaboradores a quem foi pedida esta apreciação inicial e informal. Este foi um indicador de que não se deveria avançar com todas estas hipóteses e foi precisamente essa a decisão após esta primeira experiência na empresa. Em termos de sabor a microalga *Chlorella vulgaris* foi a que teve maior aceitação por unanimidade e havendo oportunidade de incluir esta mesma microalga, mas com uma cor mais semelhante ao tradicional, logo com menos impacto visual, foi repetida a experiência, desta vez com *Chlorella vulgaris* de cor branca (*C.vulgaris* White) e amarela (*C.vulgaris* Honey). Estas tiveram de facto uma melhor aceitação, por isso foi decidido avançar os testes com a sua incorporação. Após este processo, seria necessário decidir qual o produto e, tendo em conta vários aspetos analisados, tais como, processos, matérias-primas disponíveis e objetivos de desenvolvimento da empresa, a decisão versou sobre os *croutons*.

2.3. Pesquisa bibliográfica

A primeira etapa do processo de desenvolvimento foi a pesquisa bibliográfica de informação relativa às microalgas, nomeadamente sobre as suas características químicas, vantagens nutricionais, questões de segurança alimentar e o histórico de uso na alimentação humana. A pesquisa foi essencialmente realizada na base de dados Pubmed®, e nos *websites* das entidades nacionais e internacionais mais reconhecidas em matéria de segurança alimentar, como a *World Health Organization*, *European Food Safety Authority*, *Centers for Disease Control and Prevention* e *Food and Drug Administration*, entre novembro de 2021 e maio de 2022. A pesquisa da legislação, nomeadamente os regulamentos em vigor, foi realizada sobretudo no *website* EUR-Lex e nas páginas da legislação de cada país. Adicionalmente, foram consultados os

documentos relativos às normas no âmbito da segurança alimentar, por exemplo, o *Codex Alimentarius* e a norma IFS. Por fim, a informação sobre a microbiologia foi obtida em livros. Toda a pesquisa serviu também de suporte essencial ao desenvolvimento das receitas.

3. Microalgas

As microalgas são microrganismos eucariotas (35) fotossintéticos microscópicos que são encontrados em ambientes marinhos e de água doce.(2,36) São dos organismos mais antigos conhecidos pela humanidade e estima-se que existam mais de 50.000 espécies em todo o mundo, mas apenas cerca de 30.000 espécies foram definidas e parcialmente estudadas.(37)

As microalgas podem ser uma fonte de compostos de carbono, que podem ser utilizados em biocombustíveis, suplementos de saúde, produtos farmacêuticos e cosméticos.(35) Produzem uma ampla gama de bioprodutos, incluindo polissacarídeos, lípidos, pigmentos, proteínas, vitaminas, compostos bioativos e antioxidantes. (35) As microalgas são consideradas uma fonte de alimentos promissora, sobretudo pela sua riqueza em vitaminas, minerais e proteína.(2,19,38) Possuem um alto valor nutricional, pois são também fonte de várias moléculas bioativas, como pigmentos incluindo carotenos e clorofila, hidrocarbonetos, aminoácidos essenciais, hidratos de carbono e lípidos, nomeadamente, ácidos gordos polinsaturados, o eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que são essenciais para a saúde humana (3,13,19,27,28,37,39–42) e que podem aumentar o valor nutricional dos produtos alimentares após a sua incorporação.

Devido aos diversos componentes nutricionais encontrados nas microalgas, o seu rápido crescimento e os benefícios de saúde, a procura por microalgas está a aumentar.(43)

3.1. Microalgas na alimentação

O uso de microalgas como fonte alimentar, não é estranho para os humanos, mesmo que a sua exploração comercial tenha apenas algumas décadas, desde o início da década de 50, quando o foco foi colocado numa possível oferta insuficiente de proteína devido ao rápido aumento da população mundial.(44) A proteína é um dos principais nutrientes que serão escassos no futuro, por isso são necessárias fontes e métodos de produção de proteína alternativos para atender à necessidade dos consumidores.(38)

As microalgas surgiram então como uma boa fonte de proteína e continuam como tal, mas com um interesse acrescido devido aos compostos bioativos únicos posteriormente encontrados, o que lhes confere um grande potencial como fonte de alimento e como fonte

de moléculas funcionais.(2,6) Nesse sentido, as microalgas têm sido utilizadas para melhorar o conteúdo nutricional quer de alimentos, quer de suplementos alimentares (27), estando a ser vendidas como algas inteiras ou para extração dos seus compostos, comercializados principalmente para produtos de alto valor (45) como fontes de antioxidantes, pigmentos e vitaminas.(46–48)

Com a evolução da indústria alimentar, foi possível fornecer compostos bioativos para a maioria da população adicionando-os a alimentos amplamente aceites ou consumidos regularmente, como massas, sopa ou pão.(6) Também alguns *snacks* com microalgas, como *muffins*, gressinos e biscoitos, estão a ser explorados com o objetivo de criar produtos com maior teor de proteína e maior atividade antioxidante do que os convencionais.(49)

Vários estudos realizados em Portugal no início dos anos 2000 abriram possibilidades para a inclusão da biomassa de microalgas como pigmento e ingrediente funcional em produtos alimentares.

É relevante considerar que existem vários fatores que influenciam a forma como as pessoas aceitam as microalgas nos alimentos, incluindo:

- a) Propriedades sensoriais: quando as microalgas são adicionadas aos alimentos, podem alterar a cor e o sabor dos alimentos, o que geralmente é percebido como negativo pelos consumidores. Esta pode ser a razão pela qual os produtos com adição de microalgas não estão ainda no mercado em grande número.(50)
- b) O “produto transportador”: o produto alimentar ao qual as microalgas são adicionadas desempenha um papel importante na forma como as microalgas adicionadas são aceites. Por exemplo, as pessoas são mais propensas a gostar de microalgas em massas do que em produtos como leite e pão.(51,52)
- c) Familiaridade com o sabor: as pessoas que já estão familiarizadas com o sabor das microalgas, por exemplo, são menos propensas a ter uma deceção com o sabor das mesmas em produtos alimentares.(53)
- d) Conhecimento sobre microalgas: existem diferenças entre a forma como as pessoas de diferentes países percebem os produtos alimentares de microalgas. Alguns investigadores observaram que os consumidores que têm um conhecimento geralmente maior sobre microalgas têm uma opinião mais positiva.(53)
- e) Características pessoais: indivíduos preocupados com a saúde parecem estar mais dispostos a aceitar produtos alimentares com adição de microalgas (54,55), enquanto até agora as preocupações com o meio ambiente não parecem influenciar as opiniões das pessoas, apesar do seu potencial como fonte de proteína mais sustentável.(56)

3.1.1. Melhoria da composição nutricional

A incorporação da biomassa de microalgas na receita de produtos alimentares tradicionais é uma tendência mundial, sendo que vários produtos foram já lançados em todo o mundo. Os alimentos tradicionais, como pães, massas, cereais, laticínios, que fazem parte da alimentação de todos, podem de facto ser usados como veículos para fornecer os nutrientes que os consumidores procuram.(26) Diversos alimentos foram já desenvolvidos com a incorporação de microalgas na sua formulação e as expectativas sobre esta prática são promissoras para a indústria alimentar. As microalgas têm sido incluídas para enriquecer nutricionalmente alimentos como massas (57), biscoitos (58), pudins/sobremesas gelificadas (59), maioneses/molhos para salada e pão.(60)

A composição da biomassa, que pode definir a sua incorporação em produtos alimentares, depende das espécies de microalgas, mas também dos parâmetros de cultivo. Entre os diferentes tipos de compostos derivados de microalgas, aqueles com propriedades antioxidantes são provavelmente os mais interessantes para aplicações industriais.(6)

Algumas espécies de microalgas são conhecidas por terem, na sua composição química, níveis de proteína semelhantes aos das fontes tradicionais de proteína, como carne, ovo, soja e leite.(28,37,61)

3.1.2. Efeitos na saúde

Os componentes das microalgas que mais contribuem com os seus potenciais benefícios para a saúde dos humanos são as proteínas, os lípidos e pequenas moléculas com atividade antioxidante e anti-inflamatória.(62) Estas características nutricionais beneficiam a saúde humana a vários níveis, tal como está descrito em vários trabalhos.

Sabe-se que poderá ser possivelmente aplicada no tratamento da asma e do distúrbio pulmonar obstrutivo crónico.(63) Adicionalmente, os resultados de outros trabalhos revelam ainda potenciais atividades farmacológicas que, se confirmadas por estudos *in vivo*, podem ser exploradas para a prevenção ou tratamento de diversas patologias graves, incluindo doenças inflamatórias e cancro.(64) Têm também o potencial de aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida em pessoas com fibromialgia e colite ulcerosa e diminuir ou manter estável a pressão arterial em pessoas com hipertensão.(65,66)

Há ainda outros benefícios atribuídos a algumas microalgas (por exemplo, *Chlorella spp.*, *Dunaliella sp.*, *H. pluvialis*) que produzem compostos associados a bioatividade benéfica para a saúde, por exemplo, antifúngica, antiviral, anti-cancerígena, anti-inflamatória, antioxidante e imunológica.(46)

Por outro lado, o consumo excessivo de microalgas, nomeadamente clorela, poderá levar a efeitos secundários. Alguns consumidores indicaram uma potencial correlação entre algumas marcas de suplementos em comprimidos e ocorrência de náuseas, vômitos e outros problemas gastrointestinais. Foi fundamentado que se pode verificar uma má digestibilidade e pode levar a alguns problemas gastrointestinais.(67) Assim, a clorela foi rotulada como um alergénio fraco, mas que pode ser de importância clínica para certas pessoas.(67)

Em muitas situações, as microalgas são ainda consideradas como ingredientes de alimentos funcionais. Entre o setor de alimentação saudável, podemos encontrar diversas categorias, uma delas os alimentos funcionais.(68) Estes podem ser definidos como alimentos de aparência semelhante aos alimentos tradicionais, consumidos como parte de uma alimentação regular e que podem contribuir para aumentar o estado de saúde de uma pessoa num grau superior ao esperado para um alimento comum.(2) Também Granato *et al.* definiram alimentos funcionais como alimentos naturais ou processados industrialmente que, quando consumidos regularmente dentro de uma dieta diversificada em níveis eficazes, têm efeitos potencialmente positivos na saúde.(7) Além do seu valor nutricional como alimento convencional, os alimentos funcionais auxiliam na promoção de ótimas condições de saúde e podem reduzir os riscos de uma ou mais doenças não transmissíveis, como dislipidemia, cancro, diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral e doenças cardiovasculares).(7)

Relativamente a estes efeitos na saúde dos consumidores, importa esclarecer que simultaneamente com a definição de alimentos funcionais, os principais critérios de inclusão de uma determinada alegação de um ingrediente ou alimento funcional num rótulo alimentar são a segurança alimentar, o livre acesso sem necessidade de prescrição médica e a comprovação dos benefícios para a saúde quando consumido regularmente numa dieta equilibrada. (69,70)

3.1.3. Características reológicas e organolépticas

Os componentes como o sabor, a textura e a cor são de facto preponderantes para convencer o consumo dos alimentos por parte dos consumidores.(2,40) É de facto um desafio complexo tentar produzir novos produtos alimentares com propriedades nutricionais aprimoradas sem afetar as qualidades sensoriais, que podem impedir as pessoas de os apreciar.(49)

Para além do sabor das microalgas e o seu impacto na aceitabilidade do produto, ainda há muitos outros aspetos que precisam de ser considerados. Esses aspetos dizem respeito à estabilidade dos compostos funcionais encontrados nas microalgas e à sua biodisponibilidade de acordo com a estrutura e matriz alimentar onde estão inseridos, bem como considerações quanto à preservação, embalagem e vida útil.(2) Adicionalmente, as microalgas podem ser utilizadas para melhorar a aparência dos alimentos, alterando a sua cor, estrutura e propriedades reológicas (71), uma vez que a sua adição afeta a estrutura interna do alimento devido às alterações na absorção de água ou na incorporação de lípidos.(72)

As microalgas parecem ser um ingrediente promissor não apenas na panificação, mas também no desenvolvimento de outros produtos.

Os produtos de panificação, como pão, bolachas ou biscoitos, não são geralmente expostos a altas pressões ou fortes variações de pH e têm sido efetivamente usados com sucesso como veículos alimentares para diferentes nutrientes promotores de saúde.

Uma das vantagens dos biscoitos ou bolachas em relação ao pão é que seu menor teor de humidade lhes confere maior vida útil.

Em vários trabalhos, a sua incorporação em produtos cozidos no forno, como biscoitos e pães, resultou num aumento positivo da firmeza dos mesmos.(73–76) Um aspeto positivo é que a adição de microalgas a esses produtos não altera significativamente a textura dos produtos padrão. Os estudos realizados até agora mostram que estes produtos têm um bom nível de aceitação por parte dos consumidores, apesar de alguns poderem ter cores invulgares.(49)

Por outro lado, a incorporação de biomassa de microalgas em produtos tradicionais tem-se mostrado inconveniente em alguns casos por causa de sua forte cor verde, sabor e odor de peixe.(2,28,50) É, por isso, relevante mencionar que o grau de aceitabilidade dos produtos à base de microalgas parece depender da dieta tradicional da população onde tal produto é incorporado.(2) Enquanto que na China, o investigador Liang refere que os produtos tradicionais que incorporam microalgas são considerados saborosos e muito apreciados pelos

consumidores. (77) Becker verificou que o sabor forte de peixe é uma característica negativa que limita a aceitabilidade desses produtos alimentares por outras pessoas.(28)

No entanto, a maioria dos estudos que incorporam microalgas em concentrações superiores a 3% relataram limitações tecnológicas, como diminuição do volume do pão ou atributos sensoriais negativos. Portanto, é importante selecionar não apenas as concentrações adequadas de microalgas, mas também otimizar o teor de água, bem como os tempos de mistura e fermentação para atingir os volumes específicos adequados para o pão com microalgas.(26)

Por último, quando se refere a utilização de alguns ingredientes e respectivos nutrientes, deve considerar-se que as proteínas e os lípidos em alimentos são propensos à oxidação durante o processamento industrial ou armazenamento e alguns nutrientes essenciais são destruídos, enquanto outros compostos potencialmente tóxicos poderão ser gerados.(6)

4. *Chlorella vulgaris*

A microalga do género *Chlorella* foi identificada pela primeira vez pelo investigador holandês Martinus Willem Beijerinck, em 1890, num lago nos arredores da cidade de Delft, na Holanda. (14) A produção comercial de *C.vulgaris* para biomassa começou há apenas 60 anos, no Japão em 1960 (46) e, hoje em dia, esta microalga é amplamente produzida e comercializada incorporada em suplementos alimentares, em muitos países, incluindo a China, o Japão, a Europa e os EUA.(78)

Na tabela I, encontra-se sintetizada a composição bioquímica da *C.vulgaris* descrita em vários trabalhos.

Tabela I: Composição bioquímica da *C.vulgaris*. ^a % do peso seco

| Proteína (%) ^a | HC (%) ^a | Lípidos (%) ^a | Referência |
|---------------------------|---------------------|--------------------------|------------|
| 49-55 | 7-42 | 3-36 | (79) |
| 55-67 | 9-18 | | (43) |
| 51-58 | 12-17 | 14-22 | (28) |
| 42-58 | 12-55% | 5-40 | (80) |

Sabe-se ainda que o teor médio de lípidos nas microalgas varia entre 1% e 40% e, de acordo com as condições de crescimento, pode chegar a 85% do peso seco, sendo os lípidos mais importantes o EPA e o DHA.

A *C.vulgaris* contém ainda muitos outros nutrientes, incluindo, vitaminas (complexo B e vitamina C), minerais (potássio, sódio, magnésio, ferro e cálcio), e pigmentos como caroteno e clorofila.(25,81) O teor de cada nutriente varia de acordo com a estirpe específica das microalgas e as suas respostas fisiológicas a fatores bióticos e abióticos, por exemplo, intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura, nutrientes e fase de crescimento.

Essencialmente como fonte de proteína natural à base de plantas e contendo todos os aminoácidos essenciais, a biomassa de *C.vulgaris* em pó é muito útil para uso em alimentos, bebidas e suplementos alimentares, atendendo à procura do consumidor por proteína que não contenha ingredientes de origem animal.(25)

Devido às suas características de crescimento rápido e qualidades nutritivas, a clorela irá provavelmente complementar continuamente as necessidades alimentares.(43) Assim, o valor nutricional da *C.vulgaris* assume um elevado interesse para a indústria alimentar.(37,82)

Contudo, a composição nutricional pode variar. Fabian et. al. investigaram os perfis de macro e micronutrientes de quinze pós de microalgas com sete espécies diferentes de várias empresas, para avaliar a sua contribuição no fornecimento de nutrientes para o consumo humano. Depois de analisada a composição nutricional, a *C.vulgaris* ficou colocada em segundo lugar no *ranking* das microalgas incluídas, devido ao elevado teor de aminoácidos, fibra, proteína, clorofila, vitamina D e um baixo rácio de ómega 6/ómega 3. Este trabalho também mostrou que o pó da mesma espécie de microalga, mas de marcas diferentes, pode não ter a mesma composição nutricional.(37)

Sobre as aplicações e utilização da *C.vulgaris* sabe-se que foi incluída como ingrediente medicinal na *Natural Health Products Ingredients Database* do Canadá, e como ingrediente ativo e ingrediente excipiente em medicamentos listados na *Therapeutic Goods Administration* na Austrália.(83)

4.1. Honey *Chlorella vulgaris* e White *Chlorella vulgaris*

A Allmicroalgae® apresenta dois pós inovadores de *Chlorella vulgaris*, aprovados como ingredientes alimentares e suplementos alimentares pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). (84) Em comparação com os produtos convencionais de cor

verde intensa, estas novas opções são visualmente mais neutras e oferecem um sabor discreto, apresentando o mesmo valor nutricional.(85)

Devido à crescente procura por soluções alimentares à base de plantas, por exemplo, em panificação e confeitaria, em gelados e maioneses, a clorela amarela funciona bem como substituta do ovo, enquanto a clorela branca pode substituir as bases lácteas convencionais, como o leite, aumentando o teor de proteína do produto. Ambas as clorelas são agentes de texturização e espessantes eficazes.(85) Possuem características muito interessantes para serem utilizados como ingredientes de alimentos e bebidas na formulação de alimentos funcionais e inovadores, para suplementação alimentar, como ingredientes e suplementos para rações animais e também em formulações cosméticas.(83)

A *C.vulgaris* de cor amarela é fonte de micronutrientes de elevada qualidade, cultivada exclusivamente de forma heterotrófica. Contém mais de 35% do peso seco em proteína, e inclui todos os aminoácidos essenciais. O teor total de ácidos gordos, de 7%, é composto principalmente por ómega-6 e ómega-9, e ainda possui um alto teor de fibras. Adicionalmente, esta espécie contém compostos de valor acrescentado, com a presença do pigmento natural luteína (40), e vários minerais e vitaminas, como fósforo, zinco e vitamina B₁₂. (83)

A *C.vulgaris* de cor branca é também fonte de micronutrientes de elevada qualidade e cultivada exclusivamente de forma heterotrófica. O único carotenoide presente nesta estirpe é o fitoeno que é conhecido por ser incolor.(40) Este produto contém mais de 40% de proteína por peso seco, possuindo todos os aminoácidos essenciais, um alto teor de fibras, e perfil de baixo teor de gordura.(83)

Os resultados dos estudos com estes pós sugerem que a anulação parcial da biossíntese do pigmento é um fator que pode promover maiores teores de proteína nestas espécies. Assim, devido ao seu maior teor de proteína e menor teor de clorofila, são candidatas a serem matérias-primas para o desenvolvimento de novos e inovadores suplementos alimentares e alimentos.(40)

O processo de produção das microalgas da Allmicroalgae® é descrito da seguinte forma (86):

1) Banco de Cultura de Células: as estirpes são mantidas nas condições mais adequadas para a divisão celular, e quando atingem concentrações mais elevadas, estão prontas para serem transferidas para um volume maior, com mais espaço para crescimento.

2) Fermentação: inicia-se num reator de vidro, passando posteriormente para um reator em escala industrial.

3) Reator autotrófico: Esta fase inicia-se num reator autotrófico de vidro, passando posteriormente para um reator de placa plana, também conhecido como Green Walls.

- 4) Reator tubular Industrial: Nos reatores tubulares industriais, as algas crescem naturalmente no exterior ao sol e as estirpes são mantidas nas condições mais adequadas para a divisão celular.
- 5) Concentração: A cultura de algas vivas é filtrada para separar a biomassa sólida da fase líquida.
- 6) Pasteurização: Processo de tratamento com calor da biomassa, aplicado para reduzir o número de quaisquer microorganismos patogénicos existentes.
- 7) Centrifugação.
- 8) Spray Dryer: Nesta fase, as microalgas são processadas em pó fino.
- 9) Microalgas em pasta.
- 10) Microalgas em pó.
- 11) Embalagem: O produto final é embalado, rotulado e armazenado.

4.2. Incorporação da *Chlorella vulgaris* em produtos alimentares

4.2.1. Melhoria da composição nutricional

A *Chlorella vulgaris* é uma das algas mais interessantes com potenciais propriedades bioativas. Na sua composição, encontram-se vários compostos bioativos com propriedades funcionais e tecnológicas (87) e hoje em dia é amplamente vendida como um alimento funcional e saudável devido ao seu alto teor de vitaminas e minerais.(38)

Dos produtos de microalgas comercialmente disponíveis, um estudo avaliou a bioacessibilidade de minerais em biscoitos enriquecidos com *C.vulgaris*. que mostraram uma alta acessibilidade de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, selénio e zinco, à medida que o conteúdo de microalgas aumenta dentro de concentrações aceitáveis.(62)

A *C.vulgaris* é fonte de hidratos de carbono, proteínas, fibras alimentares, vitaminas, micronutrientes e antioxidantes, sendo apreciado pelo seu sabor, versatilidade, conveniência, textura e aparência.(88)

Os resultados demonstraram os efeitos prebióticos e imunomoduladores do pó de clorela e os seus efeitos redutores de colesterol nas combinações testadas. Além disso, foi confirmada a não toxicidade da Clorela para células de mamíferos. No entanto, a aplicação de recursos naturais como algas que oferecem benefícios à saúde de humanos e animais em suplementos alimentares ou alimentos tem um potencial considerável devido à sua pronta disponibilidade, baixo custo e boas qualidades nutricionais.(89)

Os biscoitos têm sido usados com frequência em trabalhos que experimentam a incorporação de *C.vulgaris* por razões como a boa aceitação do sabor, versatilidade e consumo conveniente devido à sua facilidade de conservação e transporte, e textura e aparência apelativas.(6)

Em alguns trabalhos a *C.vulgaris* foi incorporada em *cookies* como agente corante e também como potencial antioxidante, enquanto noutros trabalhos foi usada para potenciar os benefícios nutricionais e de saúde dos biscoitos, ou seja, aumentando o teor de proteínas e antioxidantes.(58,72) Assim como os biscoitos, o pão é também amplamente consumido. (90) Alguns autores relataram a incorporação de microalgas para melhorar as propriedades nutricionais do pão há vários anos.(76) Esta microalga já foi também utilizada na produção de iogurtes e leites fermentados.(48)

É pertinente salientar que as proteínas e os lípidos dos alimentos são propensos à oxidação durante o processamento industrial ou armazenamento, isto é, os nutrientes essenciais podem destruídos e alguns compostos potencialmente tóxicos podem ser produzidos.(6)

4.2.2. Efeitos na saúde

A *C.vulgaris* é uma fonte essencial de vitamina B₁₂ que tem muitos efeitos benéficos para a saúde.(91) Possui proteínas de alta qualidade, com perfis de aminoácidos completos. É também referida como importante fonte de polissacarídeos ou oligossacarídeos, sendo proposta como potencial candidata a prebiótico.(27) A *C.vulgaris* sintetiza ácidos gordos poliinsaturados da família ómega-6 e da família ómega-3.(92) É uma rica fonte de vitaminas, nomeadamente, vitamina B₁, B₂, B₃ e B₆.(93)

A suplementação com *C.vulgaris* reduz os fatores de risco cardiovascular, melhorando os níveis totais de colesterol, colesterol LDL e a pressão arterial sistólica e diastólica.(94)

A *C.vulgaris* é rica em aminoácidos essenciais capazes de executar funções cardiovasculares reguladoras. A *C.vulgaris* tem uma poderosa capacidade de desintoxicar o corpo de metais pesados como mercúrio, cinzas e aminas heterocíclicas através da indução de enzimas antioxidantes e atua como uma resina de troca de iões.(95–97) Melhora condições de saúde fisiológica, melhorando a função imunitária e aumentando a produção de citocina.(98)

4.2.3. Características reológicas e organoléticas

A *C.vulgaris* pode ter diferentes aplicações como produtos de padaria/pastelaria, bebidas vegetais, molhos, sopas, confeitaria e comida e bebidas veganas. Relativamente às suas vantagens enquanto ingrediente alimentar destacam-se o facto de ser um ingrediente funcional, um potencializador nutricional, corante e deter características texturizantes e emulsificantes.(8,60)

A *C.vulgaris* teve um impacto positivo nas características reológicas das massas, atua nas características viscoelásticas e participa do fortalecimento da rede de glúten.(88)

A suplementação (0,5-2%) com *C.vulgaris* resulta na melhoria das propriedades de cozimento e textura. *C.vulgaris* pode aumentar a firmeza da massa.(57)

Batista *et al.* avaliaram o potencial de várias microalgas, entre elas a *C.vulgaris*, para melhorar as propriedades funcionais de biscoitos.(99) A microalga foi introduzida nas formulações nas concentrações de 2 e 6% e estas apresentaram maior teor de proteína, de compostos fenólicos e atividade antioxidante quando comparadas ao controlo.

Quanto às características organoléticas, foram observados resultados interessantes por Sahni *et al.* (99), que formularam biscoitos com farinha de microalgas do género *Chlorella sp.* em diferentes concentrações e não observaram diferenças nos atributos sensoriais em níveis de substituição de farinha abaixo de 6%. Esta microalga pode também ser usada como aditivo alimentar devido à sua influência no sabor e cor que confere aos alimentos.(44) A estabilidade da cor dos alimentos que contêm microalgas parece ser muito alta. Gouveia *et al.* usaram *C.vulgaris* como corante em biscoitos amanteigados e observaram um aumento na firmeza, evidenciado com um aumento na concentração de biomassa de microalgas, e uma cor verde estável dos biscoitos durante um período de armazenamento de três meses em temperatura ambiente.(58)

Perante a limitação da cor verde da clorela, um grupo de investigadores, incluindo investigadores portugueses, realizou um trabalho cujo objetivo foi desenvolver derivados mutantes de *C.vulgaris* com défice de clorofila, através de mutagénese aleatória quimicamente induzida para obter biomassa com diferentes pigmentações para aplicações nutricionais.(40) Como resultado desta estratégia, obtiveram-se dois mutantes de *C.vulgaris* com cor amarela e branca. Estes foram isolados, ampliados e caracterizados com sucesso. As mudanças de cor das estirpes mutantes de cor amarela e branca foram devidas a uma diminuição de 80 e 99% no seu teor de clorofila, respetivamente, em comparação com a estirpe original.

4.2.4. Alegações nutricionais e composição nutricional

As alegações nutricionais têm tido um papel importante na indústria alimentar, uma vez que podem ser decisivas na promoção da compra de determinados produtos alimentares por parte dos consumidores. O Regulamento (CE) N° 1924/2006 refere que uma alegação nutricional declara, sugere ou implica que um alimento possui propriedades nutricionais benéficas particulares devido à energia que fornece, fornece com um valor reduzido ou aumentado, ou não fornece; e/ou aos nutrientes ou outras substâncias que contém, contém em proporção reduzida ou aumentada, ou não contém.(69) A aplicação de alegações nutricionais nas embalagens tem sido cada vez mais utilizada nas estratégias de inovação e desenvolvimento de novos produtos alimentares com o objetivo de induzir uma escolha por parte dos consumidores (por exemplo, ser fonte de proteína ou ser rico em fibra).(100)

Quando o objetivo é melhorar as características nutricionais dos alimentos onde se incorporam determinados ingredientes há vários aspetos a ter em conta, nomeadamente a quantidade adicionada à receita.

No caso dos produtos com microalgas, quando há apenas a incorporação de pequenas quantidades, essas adições não melhoraram significativamente a composição macromolecular nos alimentos, por exemplo, o teor de proteína.(6)

4.3. Produção da *Chlorella vulgaris*

A clorela é uma das microalgas comercialmente mais produzidas em todo o mundo.(3,19,49) De acordo com o estudo de Rita Araújo *et al.* a *C.vulgaris* é produzida em 11 países europeus (46), sendo os maiores produtores a Alemanha, França, Itália, Espanha e Portugal.(93) As microalgas são amplamente cultivadas por diferentes métodos de produção e utilizadas em várias aplicações comerciais.

O processo de produção de espécies de microalgas industriais é único e muito exigente quanto à garantia de qualidade. O cultivo de microalgas requer condições ambientais específicas, incluindo intervalos de temperatura, intensidade de luz, composição de nutrientes e trocas gasosas. Estas podem ser cultivadas através de diferentes vias metabólicas (fotoautotróficos, heterotróficos e mixotróficos) (3,36) e diferentes sistemas de cultivo, comumente classificados como sistemas abertos e fechados (Figura 2).(3,25,101,102)

Exemplos de técnicas de crescimento autotrófico são os sistemas abertos e os fotobiorreatores fechados. Contudo, para uso alimentar só podem ser usados sistemas fechados devido ao risco de contaminação.

Algumas fábricas de produção combinam diferentes sistemas de produção, por exemplo, fotobiorreatores com fermentadores ou lagoas abertas.(46)

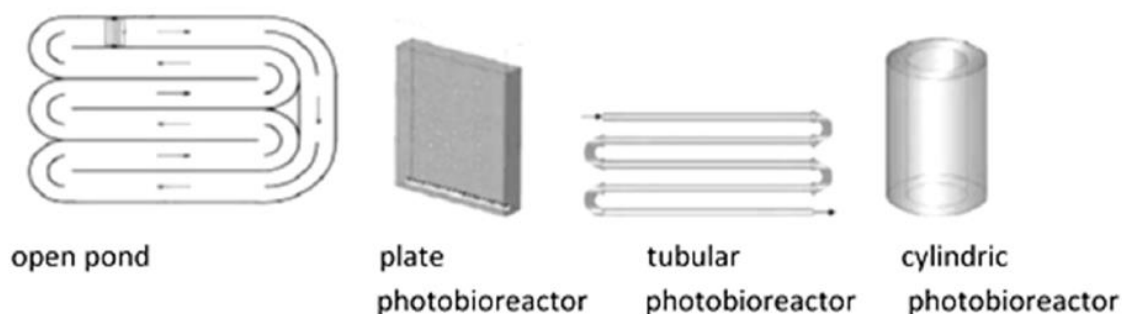


Figura 2: Diferentes tipos de sistemas de cultivo de algas.(103)

4.3.1. Sistemas abertos

A técnica de sistemas de lagoas abertas é a mais comum, por ser a mais barata para a produção da microalga em elevada escala. Estes sistemas são categorizados como águas naturais (lagoas e lagoas), águas residuais, lagoas artificiais ou recipientes, com exposição à luz solar e uma profundidade ótima de 15 a 50 cm.(104)

Os sistemas abertos têm desvantagens intrínsecas substanciais, incluindo a baixa densidade celular e produtividade de biomassa, maior exigência de terra e água, pois esta perde-se rapidamente devido à evaporação, maior probabilidade de contaminação por outros microrganismos, nomeadamente, contaminação microbiológica de pássaros, insetos e roedores, e maior dificuldade na manutenção da temperatura da cultura e entrega eficiente de nutrientes.(25,35,46,105) A ocorrência de contaminação em lagoas abertas com microalgas que possam conter toxinas microcistinas (neurotoxinas ou hepatotoxinas) poderia afetar negativamente a saúde daqueles que consomem este produto mais tarde, se não fosse seguido nenhum protocolo de controlo de qualidade nestas instalações.(62)

Em relação aos sistemas de lagoa aberta, geralmente são mais caros para construir, realizar a manutenção e extrair a biomassa, pois requerem custos adicionais em iluminação, dióxido de carbono e nutrientes para a cultura.(2,19,36,102)

4.3.2. Sistemas fechados

O FBR é o sistema mais comum utilizado para a produção de microalgas (71%), enquanto os lagos e fermentadores abertos representam 19 e 10% do total das unidades de produção, respetivamente.(46) Tipicamente, o termo bioreactor é aplicado aos recipientes que suportam o crescimento de microalgas para a produção de biomassa e formação de produtos.(36)

Os primeiros sistemas de FBR foram projetados na década de 1940, tornando possível o controlo de variáveis, como nutrientes, pH, luz e temperatura ao cultivar organismos fotossintéticos em larga escala.(106)

Os sistemas fechados ou FBRs podem ainda ser classificados em tubulares, coluna, membrana ou placa plana.(2,101,102) Os FBRs tubulares e de placa plana tornaram-se muito populares na última década (25), por conseguiram obter uma elevada densidade de culturas, até três vezes maior do que com sistemas de lagoa aberta. Estes FBRs fechados têm vantagens adicionais tais como permitirem uma recuperação mais fácil da biomassa, ajudarem a manter a cultura livre de contaminantes e ajudarem a controlar melhor as condições de crescimento. Dependendo do modelo e da aplicação, os biorreatores avançados podem controlar vários fatores ambientais, como pH, temperatura, irradiação e aeração que precisam ser ajustados antes do cultivo de microalgas. Esses parâmetros não afetam apenas o crescimento de microalgas, mas também influenciam a composição bioquímica da biomassa de microalgas.(36) O principal objetivo do desenvolvimento de FBRs é maximizar o crescimento de algas através do fornecimento ideal de luz a finas camadas de suspensão de microalgas.(102) Nos FBRs fechados, a cultura é separada da atmosfera por um material transparente, seja plástico ou vidro.(3,36)

Por outro lado, os FBRs fechados têm o potencial de superar os problemas de evaporação, contaminação e baixa produtividade de biomassa encontrados nos sistemas abertos.(102)

A escolha dos FBRs depende de vários fatores, incluindo a produtividade da biomassa e os produtos finais.

A estabilidade da espécie *C.vulgaris* e o uso do processo de produção fechado permitem criar um produto padronizado, reprodutível e livre de contaminantes. As microalgas fotoheterotróficas como a *C.vulgaris* são um grupo de microalgas que requerem luz como fonte de energia, e carbono orgânico como fonte de carbono. (36)

A produção das espécies de *C.vulgaris* usadas no presente trabalho aconteceu através do cultivo heterotrófico em FBRs de placa plana e FBRs tubulares. Os primeiros combinam muitas

vantagens porque têm uma alta proporção de área iluminada por volume e uma forma fácil de controlar a temperatura colocando água na superfície irradiada ou submergindo o fundo do FBR numa piscina de água. São considerados um dos tipos de reatores mais promissores para cultivo em massa de microorganismos fotossintéticos.

Na produção de microalgas podem ser usadas uma ou mais etapas de separação sólido-líquido para a recuperação da biomassa. Essas etapas de separação geralmente são a centrifugação, floculação, sedimentação por gravidade e filtração, e podem ser usadas de forma isolada ou combinada.(2)

Relativamente à *C.vulgaris* amarela e branca usadas especificamente no presente trabalho, a empresa descreve o método de produção da seguinte forma (107):

- A produção da *C.vulgaris* heterotrófica inicia-se com a manutenção de culturas puras como banco de células mestre sob condições refrigeradas.
- O banco de células mestre gera o inóculo para um fermentador de cinco litros e o fermentador de cinco litros gera o inóculo para a escala sucessiva até atingir a escala industrial de cinco mil litros.
- A biomassa produzida neste fermentador industrial é colhida e a cultura é armazenada na ausência de luz com aeração.
- A primeira etapa de processamento é a etapa de lavagem por microdiafiltração que permite obter melhores características organolépticas removendo os sabores desagradáveis e o excesso de nutrientes. Esta etapa também concentra a cultura que é então armazenada na ausência de luz até ser usada.
- A cultura concentrada é processada por um sistema de pasteurização de alta temperatura (mínimo 74°C) e durante um curto tempo (mínimo de seis segundos) que garante a destruição de quaisquer patogênicos vegetativos e outros microrganismos presentes na cultura. Esta etapa é um ponto crítico de controlo (PCC) de acordo com a análise HACCP realizada pela empresa. Após a etapa de pasteurização, o produto concentrado é seco por pulverização para obter a sua forma de pó.
- Depois de passar por um detetor de metais, o produto é embalado em sacos compatíveis com alimentos, que incluem um absorvedor de oxigénio, e armazenado à temperatura ambiente.

A *C.vulgaris* pode ser facilmente cultivada com uma rápida taxa de crescimento, no entanto, o custo de processamento de produção continua elevado para competir no mercado. De facto,

este é o principal problema que a indústria de microalgas enfrenta, mas foram várias as melhorias alcançadas durante a última década. As expectativas são otimistas e estimam que o futuro próximo da indústria de microalgas será fortemente competitivo em diferentes níveis no mercado.(80)

5. Legislação

O histórico de consumo de uma alga afeta o seu estatuto regulamentar.(93) Na União Europeia (EU), a adequação de uma alga para consumo alimentar humano e entrada no mercado é regida pelo Regulamento de Novos Alimentos (UE) n.º 2283/2015 (108), que visa facilitar que as empresas possam trazer alimentos novos e inovadores para o mercado da UE, mas mantendo um alto nível de segurança alimentar para os consumidores europeus. Com este regulamento, a UE, através da EFSA, garante que os novos alimentos e novos ingredientes alimentares são submetidos a uma avaliação de segurança através de um procedimento universal a fim de proteger a saúde pública.(108)

De acordo com este regulamento, um novo alimento é definido como um alimento que não tenha sido consumido de forma significativa na UE antes de 15 de maio de 1997.(109) Contudo, devido ao seu longo histórico de uso (2,110), o acesso da microalga *C.vulgaris* ao mercado não está sujeito à aplicação do Regulamento referido.(111) A *C.vulgaris* assume então uma relevância especial ao poder ser utilizada como ingrediente alimentar, uma vez que é autorizada pela EFSA.

Atualmente, apenas dez espécies de microalgas são autorizadas pela Comissão Europeia para alimentação humana, na forma de pó ou comprimidos (37): *Aphanizomenon flos-aquae*, *Arthrospira platensis*, *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Odontella aurita*, e *Tetraselmis chuii*.(112) Estas foram sucessivamente aprovadas como alimentos ou ingredientes alimentares após o cumprimento dos procedimentos da nova regulamentação alimentar.(112)

A revisão *Edible Seaweed and Microalgae - Regulatory status in France and Europe*, ilustra que o uso de algas e microalgas comestíveis ainda é regido por várias regulamentações e orientações europeias e nacionais.(113)

A 1 de Janeiro de 2006 entrou em vigor a reforma da regulamentação europeia em matéria de higiene alimentar, designada “Pacote de Higiene”, que simplificou e harmonizou a legislação aplicável na União Europeia. O seu objetivo é harmonizar e melhorar o nível de segurança alimentar “do prado ao prato”, envolvendo todos os intervenientes na cadeia alimentar e

submetendo-os aos mesmos requisitos. No entanto, não foram estabelecidos critérios específicos para as algas a nível europeu.(113)

Há ainda dois regulamentos europeus que se aplicam à comercialização de microalgas, especialmente a *C.vulgaris*, ou aos seus componentes: a) segurança alimentar e b) alegações nutricionais e de saúde:

- a) A introdução no mercado de produtos alimentares que usem algas ou produtos que incluam microalgas estão sujeitos aos regulamentos de segurança alimentar que se aplicam a todos os géneros alimentares, isto é, o Regulamento da Comunidade Europeia sobre Segurança Alimentar (CE) N.º 178/2002 (114), que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar.
- b) Em 2006, foi introduzido o Regulamento (CE) N.º 1924/2006 (69) relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. Este regulamento afirma que as alegações de saúde relativas a alimentos devem ser baseadas e fundamentadas por evidências científicas (Artigo 6.º). As alegações de saúde só devem ser autorizadas na UE após uma avaliação científica exigente. O regulamento afirma ainda que a fundamentação deve ser o principal aspeto a ser tido em consideração para validar o uso das alegações nutricionais e de saúde e os operadores de empresas do setor alimentar que usam alegações devem justificá-las.

Desta forma, é possível compreender que não existe legislação harmonizada para as microalgas na Europa. Em Portugal não existe qualquer legislação relativa às microalgas, em particular em relação à microalga *Chlorella vulgaris*, especialmente como ingrediente alimentar, ao contrário de outros países como a França, Itália e Bélgica, por exemplo, que incluem a *C.vulgaris* nas suas listas como suplemento alimentar.(115) A pressão do mercado sobre estes produtos é ainda frágil, embora a procura de produtos dietéticos e a diversificação dos hábitos alimentares esteja claramente em franco crescimento

A complexidade e/ou inexistência de algumas regulamentações nacionais e da UE em aspetos como licenças de cultivo, bem como definição de valores-limite, variáveis de medição e a falta de harmonização de diretrizes para certificação orgânica entre países também representam uma limitação.(46)

6. Segurança alimentar

Um aspeto fundamental da produção de alimentos é garantir que sejam seguros para o consumo humano. É fundamental para sustentar a vida e priorizar a saúde pública.(116)

As crises de doenças transmitidas por alimentos continuam a surgir e a sua disseminação é geralmente grande devido ao facto de hoje o sistema de processamento e distribuição de alimentos altamente concentrado. É um desafio constante e dinâmico acompanhar a evolução do abastecimento alimentar e mantê-lo seguro. Estes desafios levaram a preocupações sobre a adequação da identificação de perigos e redução de riscos que conduziram a pedidos de regulamentação mais rigorosa para evitar riscos de segurança.(117)

A segurança alimentar não é absoluta e em 1993 a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Económicos (OCDE) preparou uma definição de segurança alimentar sendo “uma certeza razoável de que nenhum dano resultará dos usos pretendidos sob as condições previstas de consumo”. Esta definição reconhece que a tolerância zero aos riscos não é viável para a maioria dos alimentos e a maioria dos contextos de segurança.

A globalização desencadeou uma procura crescente dos consumidores por uma variedade de alimentos maior, resultando numa cadeia alimentar cada vez mais complexa e mais longa, por isso os produtores, distribuidores, manipuladores e vendedores de alimentos são também responsáveis por garantir a segurança alimentar. No entanto, também os consumidores devem permanecer vigilantes e ser instruídos sobre questões de segurança alimentar.(4) Os alimentos tornaram-se uma via de exposição humana relevante, a microrganismos patogénicos responsáveis por doenças transmitidas por alimentos, alguns surtos locais podem transformar-se em emergências internacionais devido à velocidade e alcance da distribuição do produto.(4) Alimentos inseguros representam uma ameaça à saúde global sendo os jovens, os idosos e os doentes os grupos particularmente vulneráveis.(4,116) Alimentos inseguros impedem o desenvolvimento socioeconómico e podem ter repercussões prejudiciais para a segurança alimentar. Não só causam doenças e desnutrição, como também exercem pressão adicional sobre os sistemas de saúde e impactam a economia.(116) A segurança alimentar é uma responsabilidade conjunta de todos os parceiros da cadeia de abastecimento alimentar, do prado ao prato.(116)

A segurança alimentar está relacionada com a presença de perigos nos produtos alimentares no ato do consumo. Perigo é um agente biológico, químico ou físico presente no alimento, ou situação por ele causada, que tenha um efeito adverso na saúde.(118) Os perigos físicos podem ter várias origens, desde objetos presentes em matérias-primas, até objetos introduzidos nos produtos alimentares pelos processos a que estão sujeitos, ou pelos próprios manipuladores. Esta contaminação física do alimento pode ocorrer com madeiras, metais, pedras, materiais de revestimento ou isolamento, plásticos, limalhas de alumínio, palitos, cabelos, objetos de uso pessoal, ossos e espinhas.(119) Os perigos químicos englobam aditivos alimentares, usados em

concentrações excessivas, pesticidas, antibióticos, metais pesados, toxinas naturais (produzidas por exemplo por cogumelos, peixes exóticos, marisco), alergénios, desinfetantes ou detergentes.(118,119) Os perigos biológicos incluem as bactérias, fungos, vírus, parasitas e toxinas microbianas. Alguns destes organismos vivem e desenvolvem-se nos manipuladores, podendo ser transmitidos aos alimentos por processos de contaminação cruzada. Outros ocorrem naturalmente no ambiente onde os alimentos são produzidos. A maior parte destes perigos é destruída por processamentos térmicos e muitos podem ser controlados por práticas adequadas de armazenamento e manipulação, boas práticas de higiene e fabrico, controlo adequado do tempo e temperatura de confeção.(120) Os perigos microbiológicos constituem um problema sério e imediato à saúde humana. Deste modo, os alimentos ou a água podem ser o veículo de transmissão de agentes patogénicos, podendo permitir o crescimento até à dose infecciosa, originando as infeções alimentares, ou então permitir o seu crescimento e a produção de toxinas que afetam o consumidor, provocando uma intoxicação alimentar.(121)

Dois meios essenciais para proteger a saúde diante dos desafios de segurança é utilizar técnicas apropriadas de processamento e preparação de alimentos e ter um forte programa regulamentar.(117) Na UE, existem medidas reguladoras robustas que garantem a segurança alimentar em toda a cadeia alimentar, permitindo que os consumidores tenham total confiança no que compram. Como resultado, os alimentos e bebidas da Europa estão entre os mais seguros do mundo e não é surpreendente que a Europa seja o maior exportador mundial de alimentos e bebidas.(116) Contudo, nas últimas décadas, as questões de segurança alimentar não diminuíram. São vários os seus desafios encontrados principalmente no âmbito da segurança microbiológica, segurança química, higiene pessoal e higiene ambiental.(4) Um fornecimento seguro de alimentos é importante para a sociedade, principalmente por causa da ocorrência de doenças bem como no âmbito económico, uma vez que o acesso a quantidades suficientes de alimentos seguros e nutritivos é crucial para sustentar a vida e promover a saúde e o crescimento económico.(4)

Embora nós, como consumidores, possamos considerar a segurança alimentar como garantida, não o devemos fazer, porque embora a UE mantenha alguns dos padrões alimentares mais seguros, segundo a OMS, em todo o mundo, 600 milhões de pessoas adoecem e 420.000 morrem a cada ano após ingerir alimentos contaminados.(122)

À luz dos incidentes recorrentes de contaminação de alimentos, a segurança alimentar deve expandir-se além da melhoria do perfil nutricional, transparência de ingredientes e regulamentação para incluir monitorização regular, vigilância e fiscalização de produtos

alimentares com o fim último da promoção do bem-estar do público em geral e prevenção de doenças transmitidas por alimentos.(123)

Em geral, os consumidores confiam no governo para garantir que todos os produtos alimentares sejam não apenas seguros, mas vendidos com o que alegam conter. (4) O fornecimento seguro de alimentos depende tanto da ciência quanto da aplicação das leis em matéria de segurança alimentar. Periodicamente, novas leis e regulamentos devem ser promulgados para proteger ainda mais o fornecimento contínuo de produtos alimentares seguros e saudáveis para a saúde e o bem-estar das pessoas. Na maioria dos países, o objetivo geral das agências de segurança alimentar, como por exemplo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) em Portugal, é assumir a responsabilidade pelo cumprimento das leis de segurança alimentar para garantir a proteção da saúde e a segurança pública.

No âmbito da segurança alimentar, a avaliação de risco é um processo científico que coloca na perspetiva adequada a preocupação com a contaminação dos alimentos. (4) Em geral, a monitorização periódica de alimentos fornece uma garantia de 95% de que contaminantes microbianos ou químicos de qualquer alimento alvo são detetados se ocorrerem em mais de 1% dos lotes de produtos. Adicionalmente, a vigilância alimentar é utilizada para investigar e controlar a movimentação de produtos potencialmente contaminados.(4)

De acordo com o artigo 14º do Regulamento (CE) 178/2002 de 28 de janeiro, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentares, não poderão ser colocados no mercado quaisquer alimentos que não sejam seguros, ou seja, se se entender que são prejudiciais para a saúde e impróprios para consumo humano.(114)

6.1. Alergénios

Os alergénios alimentares são, principalmente, proteínas que afetam indivíduos sensíveis através de reações imunomediadas.(124) Segundo o Regulamento (UE) N° 1169/2011 (34), relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, certos ingredientes utilizados na sua produção podem provocar alergias ou intolerâncias em algumas pessoas, e que constituem um perigo para a saúde das pessoas afetadas. Neste sentido, “deverão ser fornecidas informações sobre a presença de aditivos alimentares, auxiliares tecnológicos e outras substâncias ou produtos com efeitos alergénicos ou de intolerância cientificamente comprovados, para que os consumidores, em particular os que sofrem de

alergias ou intolerâncias alimentares, possam tomar decisões informadas, que não apresentem riscos para os mesmos”. A informação dos alergénios enumerados no anexo II deste regulamento é obrigatória, tal como está explícito no artigo 9º, do capítulo IV. Os alergénios presentes no anexo II são: cereais que contêm glúten e produtos à base destes cereais, crustáceos e produtos à base de crustáceos, ovos e produtos à base de ovos, peixes e produtos à base de peixe, amendoins e produtos à base de amendoins, soja e produtos à base de soja, leite e produtos à base de leite, frutos de casca rija, aipo e produtos à base de aipo, mostarda e produtos à base de mostarda, sementes de sésamo e produtos à base de sementes de sésamo, dióxido de enxofre e sulfitos em concentrações superiores a 10 mg/kg ou 10 mg/l em termos de SO₂ total, tremoço e produtos à base de tremoço e moluscos e produtos à base de moluscos.(34)

A rotulagem é uma ferramenta muito importante de gestão de risco e comunicação de risco. As substâncias ou produtos que causam alergias ou intolerâncias, bem como os ingredientes e auxiliares de processamento originários de uma substância ou produto que causa alergias ou intolerâncias, devem ser declarados para alimentos pré-embalados e não pré-embalados, a menos que os derivados sejam especificamente isentos pela legislação.(125)

A avaliação dos riscos não foi ainda abordada sistematicamente para as proteínas extraídas de microalgas, e a atenção tem sido colocada nos efeitos secundários desses novos alimentos, incluindo reações alérgicas em populações sensibilizadas.(126–128) As microalgas e os fungos partilham condições de cultivo semelhantes, e a possibilidade de pessoas sensíveis aos fungos desenvolverem reações adversas equivalentes às algas não pode ser excluída.(67,129)

Algumas proteínas suspeitas que ocorrem em extratos de microalgas de clorela, mostram semelhança significativa na sequência genómica com alergénios alimentares conhecidos, a maioria dos quais associados a peixes e crustáceos. A alta percentagem de identidade com sequências de aminoácidos contíguas de algumas proteínas de algas, marcadas como potenciais alergénios, podem expor a saúde dos indivíduos sensibilizados a alguns riscos. Embora sejam necessários estudos clínicos adequados para avaliar a alergenicidade tangível dessas microalgas, as partes interessadas estão suficientemente informadas para tomar decisões bem fundamentadas.

Tiberg *et al.* (130) estudaram os efeitos dos extratos *C.vulgaris* desencadeados em crianças dos 6 aos 17 anos, com ou sem outras alergias, utilizando uma picada na pele. Descobriram que as amostras purificadas apresentavam uma atividade vinculativa reduzida de imunoglobulina E (IgE) em comparação com as brutas. Yim *et al.* (131) relatou também um caso de nefrite tubulointersticial aguda desenvolvida num menino, após três meses de ingestão de cápsulas de

clorela como suplemento alimentar.(131) A recolha a larga escala na UE de um lote de *Organic Chlorella Power (Chlorella vulgaris)* em abril de 2018 devido à presença de sulfitos colocou questões sobre as origens do alergénio dióxido de enxofre (SO₂) em microalgas.(132) Uma explicação para o resultado positivo poderia ter sido o facto de o produtor ter deliberadamente adicionado o SO₂ durante o processo de produção para aumentar os rendimentos nos lagos em crescimento ou durante o processamento pós-colheita para uma maior durabilidade e prazo de validade. Outra explicação alternativa é que o SO₂ poderia ter estado presente como um contaminante na água utilizada para o cultivo das algas, no entanto as investigações não mostraram provas disso.

A presença de SO₂ natural nos alimentos é do conhecimento comum há vários anos. Surgiram evidências recentes de níveis de sulfitos em produtos alimentares de microalgas (*Spirulina* e *Chlorella*) provenientes de uma vasta gama de fontes alimentares que excedem o limite permitido de <10ppm. Por conseguinte, a recomendação das autoridades competentes de incluir a declaração de alergénios "Contém sulfitos naturais" na embalagem permanece.(133) A maioria dos pacientes que reagiram à clorela também foram sensíveis a muitos outros componentes. Portanto, não se encontrou nenhum sintoma especificamente relacionado com a sensibilização à clorela. Este estudo, no entanto, confirma claramente que a clorela é um alergénio e pode ter significado clínico em certos grupos de pacientes.(67)

Nos ingredientes usados no presente trabalho, verifica-se a presença do alergénio glúten de trigo, presente na farinha de trigo e ainda, apesar de não serem adicionados ao processo, os sulfitos estão naturalmente presentes na clorela uma vez que são subprodutos do seu metabolismo. No entanto, neste caso o sulfito não é considerado alergénio porque está presente numa quantidade inferior a 10 mg/kg (Anexo A).

6.2. Microorganismos e Contaminação

A clorela é reconhecida como alimento seguro enquadrada na categoria GRAS - Generally Recognised As Safe (Geralmente Reconhecida como Segura) pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América.(2,27,111)

São necessários muitos ensaios toxicológicos para qualquer novo alimento antes de poder ser declarado seguro para consumo humano. A maioria desses testes são detalhados para comprovar a inocuidade do produto. Ao considerar as informações disponíveis sobre possíveis propriedades tóxicas, ou quaisquer outros efeitos adversos das diferentes algas testadas até agora, pode-se afirmar que nenhuma delas apresentou efeitos negativos. Todos os testes,

incluindo estudos em humanos, não revelaram qualquer evidência que restrinja a utilização de material de algas devidamente processado.(28) No entanto, os aspetos relacionados com a segurança alimentar das algas não são bem conhecidos, nomeadamente a presença de contaminantes ou substâncias geradas durante o processamento das microalgas. (6) Em matéria de segurança alimentar, os potenciais perigos encontrados nas microalgas marinhas foram: metais pesados, pesticidas, patogénicos, alergénios, toxinas e contaminantes do processamento.(105)

Na produção de microalgas, o controlo de contaminações é uma tarefa essencial para garantir a viabilidade do inóculo e a qualidade do produto. No âmbito da monitorização de culturas de microalgas produzidas a nível industrial é importante controlar as cianobactérias e possíveis toxinas por elas produzidas. Esta monitorização é uma tarefa fundamental no processo de produção de microalgas pois as cianobactérias são um dos contaminantes mais problemáticos, não só pelo facto de apresentarem uma taxa de reprodução bastante elevada, mas principalmente, pelo facto de existirem espécies produtoras de toxinas.(46,134) A monitorização torna-se ainda mais premente quando se trata de culturas direcionadas para o setor alimentar, nomeadamente para suplementos e ingredientes alimentares.

Apesar dos benefícios relatados, também existem numerosos estudos a indicar que a ingestão de grandes quantidades de clorela pode resultar em efeitos colaterais graves. Por exemplo, a ingestão excessiva de clorela foi documentada como causadora de alergias, náuseas, vômitos e outros problemas gastrointestinais.(135) Além disso, existem muitos outros compostos bioativos ainda a serem descobertos. Assim, há uma necessidade imediata de detetar metabolitos potencialmente nocivos, bem como desenvolver métodos para extrair compostos direcionados de microalgas em vez de usar toda a biomassa.

As microalgas não parecem exceder os níveis legais de metais pesados.(134) Foi relatado anteriormente que alguns suplementos alimentares de microalgas podem conter um alto teor de alumínio, provavelmente como resultado do uso de cloreto de alumínio como floculante para recolher a biomassa.(121) Sabe-se também que alguns indivíduos, principalmente aqueles com insuficiência renal, podem ser mais propensos aos efeitos tóxicos do alumínio devido à sua maior retenção e conseqüentemente, bioacumulação. (136) Rzymiski *et al.* avaliaram o teor de metais tóxicos e oligoelementos (cálcio, cobre, potássio, magnésio, manganês, selénio, ferro e zinco) em suplementos alimentares de clorela originários de diferentes regiões do mundo e registados para distribuição na UE. Embora alguns dos produtos selecionados por este estudo tenham revelado níveis elevados de metais tóxicos, como alumínio ou chumbo, isso não deve ser motivo para desconsiderar as propriedades bioativas muito promissoras da clorela. É mais

uma indicação de que o controlo de qualidade desses produtos deve ser reforçado para que apenas os suplementos alimentares de microalgas que garantam a segurança do consumidor possam chegar ao mercado.(137)

6.3. IFS Food - International Featured Standards

A primeira versão da IFS (International Featured Standards) *Food* surgiu em 2003, designada para certificar fornecedores que produzem produtos alimentares de marca própria para o retalho. Engloba vários padrões de segurança e qualidade que fornecem transparência e comparabilidade ao longo de toda a cadeia de fornecimento.

A IFS Food deve ser usada quando um produto é processado ou onde houver risco de contaminação do produto proveniente da embalagem primária. Esta norma está direcionada para a indústria agroalimentar definindo requisitos para as organizações que pretendem diferenciar-se pela excelência na qualidade, segurança alimentar e satisfação dos seus clientes.(138)

A IFS está dividida em cinco capítulos: responsabilidade da gestão de topo, sistema de gestão da qualidade, gestão de recursos, processo de produto e medições, análise e melhorias. As normas IFS são aplicáveis a uma variedade de operações e atividades no setor alimentar e não alimentar. Todas elas seguem uma abordagem baseada no risco, permitindo assim flexibilidade na implementação dos requisitos, em cada negócio, com base nos riscos específicos em relação aos seus produtos e processos.

É construída sobre aspetos gerais de um sistema de gestão de qualidade e segurança alimentar. Desde 1 de julho de 2021 que é obrigatório usar a versão 7 da norma. É objetivo da certificação IFS Food avaliar se as atividades de processamento de um fabricante são capazes de produzir produtos seguros, legais e em conformidade com as especificações do cliente. É por isso que tanto a segurança como a qualidade do produto são componentes essenciais. A avaliação IFS é focada no produto e no processo e garante que o desenvolvimento de produtos de alta qualidade seja assegurado.

6.3.1. Plano HACCP

A base do sistema de gestão de segurança alimentar de qualquer empresa do setor agroalimentar deve ser um plano HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), em português, Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos, seguindo os princípios do Codex

Alimentarius (139) e quaisquer exigências legais dos países produtores e de destino que podem ir além de tais princípios. É atualmente reconhecido a nível mundial como o sistema de segurança alimentar mais eficaz. Consiste na identificação e avaliação de perigos específicos e na implementação de medidas para o seu controlo.(140)

O plano HACCP deve ser específico e implementado no local de produção (138), deve abranger todas as matérias-primas, materiais de embalagem, produtos ou grupos de produtos, bem como todos os processos desde a entrada de mercadorias até a expedição de produtos acabados, incluindo o desenvolvimento de produtos.

A empresa deve garantir que o plano HACCP é baseado em literatura científica ou aconselhamento especializado obtido de outras fontes, que podem incluir associações comerciais e industriais, especialistas independentes e autoridades reguladoras. Essas informações devem ser mantidas de acordo com qualquer desenvolvimento de novo processo técnico.

A empresa deve assegurar que em caso de alteração de matérias-primas, materiais de embalagem, métodos de processamento, infraestrutura e/ou equipamentos, o plano HACCP é revisto para garantir que os requisitos de segurança do produto são cumpridos.

De acordo com o *Codex Alimentarius* (139) o sistema HACCP consiste em sete princípios:

Princípio 1 - Proceder a uma análise de riscos. Preparar um fluxograma com todas as etapas do processo e identificar e listar os potenciais perigos, especificando as medidas preventivas para o seu controlo;

Princípio 2 - Determinar os Pontos Críticos de Controlo (PCC's);

Princípio 3 - Estabelecer limite(s) crítico(s). Estes limites devem ser respeitados para garantir que cada PCC está sob controlo;

Princípio 4 - Estabelecer um sistema para monitorizar o controlo dos PCC's através de observações e testes periódicos programados;

Princípio 5 - Estabelecer a ação corretiva a tomar quando a monitorização indica que um CCP em concreto não está sob controlo;

Princípio 6 - Estabelecer procedimentos de verificação para confirmar que o sistema HACCP funciona eficazmente;

Princípio 7 - Estabelecer documentação relativa a todos os procedimentos e registos adequados a estes princípios e à sua aplicação.

6.3.2. Food fraud e food defense

Ao longo da última década, o foco dos desenvolvimentos de segurança alimentar em todo o mundo passou para a defesa dos alimentos (após o 11 de setembro nos EUA) e, mais recentemente, para a prevenção de fraudes alimentares.(10)

O desafio da inovação e desenvolvimento de novos produtos tem a interferência de várias questões, incluindo o aumento da complexidade das cadeias de abastecimento de alimentos, stress ambiental, envelhecimento da população crescente e mudanças nos padrões de escolha do consumidor.(10) Nesse contexto, a segurança alimentar refere-se também a questões de defesa e fraude alimentar, incluindo a autenticidade dos alimentos. No âmbito das autoridades competentes em todo o mundo, a prevenção de fraudes alimentares é um tema relevante para o negócio agroalimentar. Por esse motivo, os sistemas de gestão da qualidade estão atualmente adaptados para incluir ferramentas de avaliação de vulnerabilidade à fraude alimentar. Até agora, os sistemas de gestão de segurança alimentar concentraram-se geralmente na contaminação não intencional de alimentos por ingredientes conhecidos, patogénios, manuseamento incorreto ou processamento. Embora a grande maioria dos casos de fraude alimentar relatados não tenha resultado em ameaça à saúde do consumidor, alguns atos de fraude alimentar, como a adição de substâncias adulterantes, podem-se tornar perigosos.(10) A fraude alimentar abrange uma ampla gama de atos fraudulentos deliberados, geralmente com motivação intencional e económica, incluindo adição, diluição, adulteração ou deturpação de alimentos, ingredientes alimentares ou embalagens de alimentos, e inclui declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto. Como resultado do impacto nas economias e na confiança do consumidor, os governos estão a responsabilizar as autoridades alimentares competentes pela proteção contra todos os riscos e vulnerabilidades alimentares, incluindo segurança alimentar e autenticidade ou fraude alimentar, através do Regulamento da UE 2017/625.(141)

De acordo com a norma IFS, deve ser realizada uma avaliação documentada da vulnerabilidade à fraude alimentar em todas as matérias-primas, ingredientes, materiais de embalagem e processos terceirizados, para determinar os riscos de atividade fraudulenta em relação à substituição, rotulagem incorreta, adulteração ou falsificação. Os critérios considerados na avaliação de vulnerabilidade devem ser definidos pelas empresas do setor alimentar e deve ser desenvolvido um plano de mitigação de fraude alimentar, documentado com referência à avaliação de vulnerabilidade, que deve ser posteriormente implementado para controlar

quaisquer riscos identificados. A prevenção da fraude alimentar passa pela avaliação e gestão de riscos.

Como é usual para os sistemas de gestão da qualidade, os sistemas de gestão de fraude alimentar são baseados num processo contínuo seguindo normalmente uma abordagem de gestão de risco empresarial e usando o sistema planear-fazer-verificar-agir (PDCA – *Plan, Do, Check, Act*). Geralmente começa com uma avaliação para caracterizar as vulnerabilidades de fraude alimentar, que inclui conhecimento sobre materiais usados e riscos existentes (por exemplo, origens geográficas, histórico, fatores económicos, revisão de incidentes e questões emergentes), fornecedores ativos, cadeia de suprimentos (comprimento, complexidade, e arranjos de oferta e demanda) e medidas de controlo existentes. O próximo passo é a conceção e revisão das estratégias de mitigação e sua implementação. Se em algum momento forem conhecidas alterações na cadeia de suprimento de um ingrediente ou um adulterante recém-identificado para um ingrediente, que possam impactar as vulnerabilidades identificadas anteriormente, todo o processo deve ser reavaliado para garantir sua eficácia contínua.

É de notar que a conformidade com o GFSI já exige uma avaliação de vulnerabilidade à fraude alimentar e um plano de mitigação, o que obriga as empresas de alimentos a agir.(10)

Foi também elaborado pela Rialto um plano *Food Fraud*, que consiste na implementação de medidas para evitar fraudes em alimentos. A elaboração do plano foi baseada na análise de risco da autenticidade das matérias-primas. Para isso foi avaliada a probabilidade (existência de histórico de fraude /risco do país de origem; dimensão da cadeia de fornecimento; fatores económicos e/ou disponibilidade de matéria-prima; facilidade de adulteração-forma de embalagem e/ou disponibilidade de substitutos) *versus* capacidade de deteção (facilidade visual de deteção da Fraude-estado físico, embalagem, entre outros; existência de certificados (de Origem) emitidos por entidades oficiais/ independentes; existência de controlos que permitem a deteção da fraude; tipo de controlo sobre os fornecedores de matérias primas).

A Rialto® possui também um plano *Food Defense* (defesa dos alimentos) que consiste na implementação de medidas para a proteção e segurança dos produtos alimentares, sendo aplicadas em toda a cadeia produtiva para garantir que estes tenham qualidade conforme as especificações pré acordadas entre cliente e indústria. A defesa alimentar passa pelos procedimentos implementados para garantir a proteção de alimentos e sua cadeia de suprimentos contra ameaças maliciosas e ideologicamente motivadas. O plano deve ser desenvolvido considerando diferentes fatores que podem incluir: construção/projeto da instalação (*layout* geográfico, instalações adjacentes, índice criminal da zona), acessibilidade ao estabelecimento (os edifícios de produção fechados), contratação de funcionários temporários

pode ser um grande risco nas instalações, a natureza de alguns produtos alimentares pode torná-los mais vulneráveis a ataques intencionais de adulteração do que outros. Existem outros fatores que podem também aumentar o risco de adulteração intencional, tais como funcionários descontentes, diferenças, políticas, comerciais, pessoais ou outras, mudanças na cultura organizacional, disrupção económica/ganho financeiro e danos a outros.

7. Materiais e Métodos

7.1. Matérias-primas e máquinas

A espécie de microalga usada neste trabalho foi a *Chlorella vulgaris* fornecida pela empresa portuguesa Allmicroalgae® Natural Products. Foram selecionadas duas microalgas com características semelhantes, mas cor distinta: *Chlorella vulgaris* White, de cor branca e *Chlorella vulgaris* Honey, de cor amarela. Os restantes ingredientes incluídos na receita dos croutons foram adquiridos nas respetivas empresas fornecedoras da Rialto, que são, para além da microalga, por ordem decrescente de quantidade: farinha T55, óleo de girassol, glúten de trigo, sal e levedura. Foi também adicionada água, fazendo assim parte da receita.

Para a elaboração dos *croutons* foram utilizados vários instrumentos e máquinas, entre eles, balança, amassadeira, câmara frigorífica, forno rotativo, cortadora 15x15 mm e fatiadora 15 mm.

7.2. Formulações

A utilização das novas matérias-primas e fornecedores foi aprovada pelo Departamento de Qualidade e Segurança Alimentar da Rialto, tendo sido necessário analisar as respetivas fichas técnicas onde constava a informação relativa às características organoléticas, composição nutricional (macronutrientes, perfil de aminoácidos, perfil de ácidos gordos, minerais e vitaminas), especificações microbiológicas, pesquisa de contaminantes (metais pesados, micotoxinas, dioxinas e furanos e pesticidas), condições de armazenamento e validade, declaração de conformidade e utilização na indústria alimentar, declaração da ausência de organismos geneticamente modificados (OGM), declaração de alergénios e certificações.

Para a preparação dos *croutons* utilizou-se uma receita base com a mesma quantidade de todos os ingredientes, excetuando a microalga. Foram realizadas sete formulações com diferentes percentagens de incorporação das microalgas *C.vulgaris* White e *C.vulgaris* Honey, em relação à quantidade de farinha:

- a) Padrão - Teste controlo, sem incorporação de microalgas
- b) W3% - Formulação com incorporação de 3% de *Chlorella vulgaris* White
- c) W5% - Formulação com incorporação de 5% de *Chlorella vulgaris* White
- d) W8% - Formulação com incorporação de 8% de *Chlorella vulgaris* White
- e) H3% - Formulação com incorporação de 3% de *Chlorella vulgaris* Honey
- f) H5% - Formulação com incorporação de 5% de *Chlorella vulgaris* Honey
- g) H8% - Formulação com incorporação de 8% de *Chlorella vulgaris* Honey

| a) Padrão | |
|------------------|----------------|
| Ingredientes | Quantidade (g) |
| Farinha T55 | 5000 |
| Óleo de girassol | 300 |
| Glúten de trigo | 100 |
| Sal | 50 |
| Levedura | 40 |
| Água | 2500 |
| TOTAL | 7990 |

| b) W3% | |
|--------------------------|----------------|
| Ingredientes | Quantidade (g) |
| <i>C. vulgaris</i> White | 150 |
| Farinha T55 | 5000 |
| Óleo de girassol | 300 |
| Glúten de trigo | 100 |
| Sal | 50 |
| Levedura | 40 |
| Água | 2500 |
| TOTAL | 8140 |

| c) W5% | |
|--------------------------|----------------|
| Ingredientes | Quantidade (g) |
| <i>C. vulgaris</i> White | 250 |
| Farinha T55 | 5000 |
| Óleo de girassol | 300 |
| Glúten de trigo | 100 |
| Sal | 50 |
| Levedura | 40 |
| Água | 2500 |
| TOTAL | 8240 |

| d) W8% | |
|--------------------------|----------------|
| Ingredientes | Quantidade (g) |
| <i>C. vulgaris</i> White | 400 |
| Farinha T55 | 5000 |
| Óleo de girassol | 300 |
| Glúten de trigo | 100 |
| Sal | 50 |
| Levedura | 40 |
| Água | 2500 |
| TOTAL | 8390 |

| e) H3% | |
|--------------------------|----------------|
| Ingredientes | Quantidade (g) |
| <i>C. vulgaris</i> Honey | 150 |
| Farinha T55 | 5000 |
| Óleo de girassol | 300 |
| Glúten de trigo | 100 |
| Sal | 50 |
| Levedura | 40 |
| Água | 2500 |
| TOTAL | 8140 |

| f) H5% | |
|--------------------------|----------------|
| Ingredientes | Quantidade (g) |
| <i>C. vulgaris</i> Honey | 250 |
| Farinha T55 | 5000 |
| Óleo de girassol | 300 |
| Glúten de trigo | 100 |
| Sal | 50 |
| Levedura | 40 |
| Água | 2500 |
| TOTAL | 8240 |

| g) H8% | |
|--------------------------|----------------|
| Ingredientes | Quantidade (g) |
| <i>C. vulgaris</i> Honey | 400 |
| Farinha T55 | 5000 |
| Óleo de girassol | 300 |
| Glúten de trigo | 100 |
| Sal | 50 |
| Levedura | 40 |
| Água | 2500 |
| TOTAL | 8390 |

Figura 3: Receitas das diferentes formulações - ingredientes e respetivas quantidades (gramas). a) Padrão; b) W3%; c) W5%; d) W8%; e) H3; f) H5%; g) H8%.

7.3. Métodos

O fluxograma da figura 4 descreve o processo de elaboração das formulações dos *croutons*, com o principal objetivo de descrever de forma sistemática e ordenada os processos, as etapas que os integram e as suas interações como base de avaliação da possibilidade de ocorrência, aumento ou introdução de perigos para a segurança alimentar.

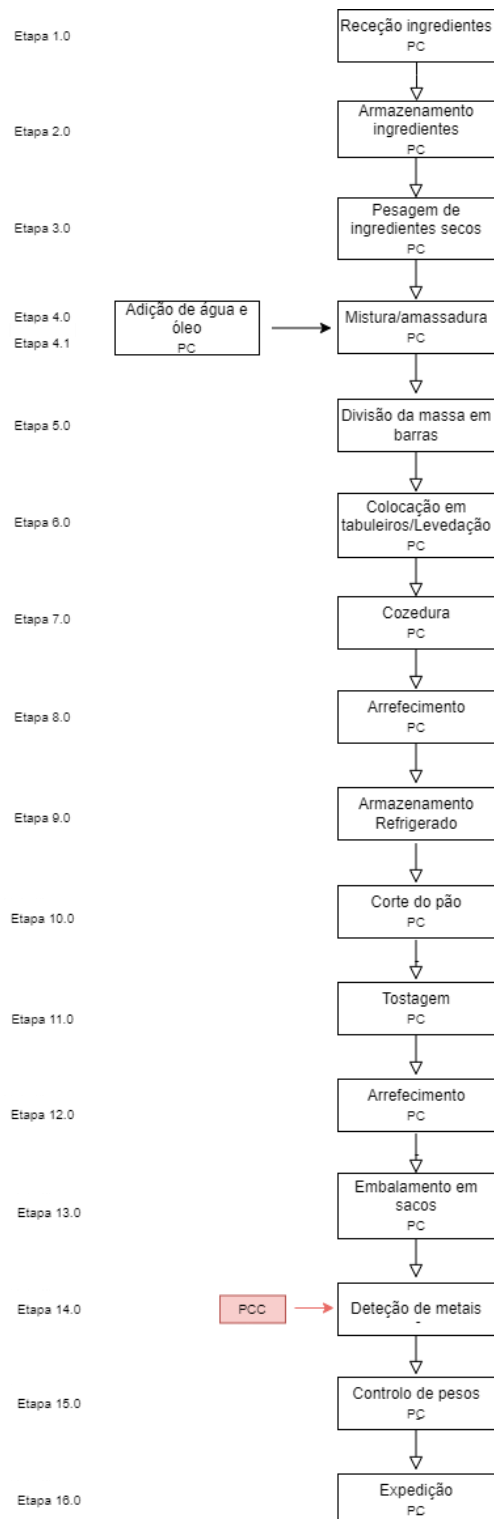


Figura 4: Fluxograma simplificado das etapas de elaboração dos *croutons*.

Neste fluxograma estão incluídas todas as etapas concretizadas e adicionalmente, aquelas que fariam parte do processo, apesar de não terem sido concretizadas no presente trabalho, nomeadamente as etapas após o arrefecimento dos *croutons*, até ao controlo dos pesos (Etapas 12.0 a 16.0). No entanto, caso os *croutons*, tivessem como objetivo final a venda ao cliente, estas seriam etapas importantes, especialmente a etapa de deteção de metais, por ser considerada um PCC.

De seguida, faz-se uma descrição breve das etapas de elaboração dos *croutons*.

- Receção ingredientes: os ingredientes são verificados à receção e encaminhados para os seus locais específicos de armazenamento.
- Armazenamento ingredientes: os ingredientes são armazenados à temperatura ambiente (<25°C), exceto o fermento que é armazenado na câmara frigorífica.
- Pesagem: todos os ingredientes são pesados manualmente, com exceção da farinha que é retirada dos silos, sendo pesada automaticamente.
- Mistura/amassadura: são adicionados à farinha de trigo, todos os ingredientes secos que compõem os *croutons*, procedendo-se à sua mistura.
- Adição de água e óleo: são adicionados à mistura dos ingredientes secos.
- Divisão da massa em barras: mecanicamente é feita a divisão da massa.
- Colocação em tabuleiros/levedação: a massa, dividida em barras, é colocada em tabuleiros onde completa o processo de levedura.
- Cozedura: a massa é cozida em fornos rotativos de acordo com os parâmetros determinados na figura 5. É controlado o tempo e a temperatura de cozedura.
- Arrefecimento: após a cozedura os carros são retirados dos fornos e são deixados à temperatura ambiente para arrefecerem.
- Armazenamento refrigerado: o pão em barras é colocado na câmara frigorífica, de forma a poder ganhar a consistência desejada, para uma operação de corte mais eficaz.
- Corte do pão: retirado dos carros, o pão é colocado nas cortadoras previamente ajustadas para o tamanho desejado; após o corte o produto passa por ímanes colocados na etapa imediatamente após a cortadora e o vibrador e obtêm-se os *croutons*.
- Tostagem: na etapa de tostagem, os *croutons* são tostados de acordo com os parâmetros determinados na figura 5.
- Arrefecimento em tapete: após a tostagem, os *croutons* arrefecem no tapete.

- Embalamento em sacos: o produto é acondicionado em sacos e identificado com o lote, ficando a aguardar embalamento.
- Embalamento: nas diversas gramagens, o produto é embalado.
- Deteção de Metais e Controlo de Pesos: todas as embalagens são sujeitas a controlo por detetor de metais e controlo automático de pesos. O produto que é rejeitado por má selagem ou rejeitado por diferença de peso é reaberto e reintroduzido na etapa de colocação na tremonha. Ocasionalmente pode ser necessário re-embalar produto que é introduzido diretamente na etapa de embalamento.
- Expedição: o produto é encaminhado para o armazém de produto acabado, onde aguardará expedição. Nesta etapa é cumprido o FIFO (*First In, First Out*).

Na figura 5 encontram-se resumidas algumas características específicas das etapas da elaboração dos *croutons* descritas anteriormente. Nas figuras 6, 7 e 8 é possível visualizar imagens reais de algumas etapas do processo.

| | |
|------------------------------|-----|
| Tempo (min) | 170 |
| 3. Cozedura | |
| Tempo (min) | 25 |
| Temperatura (C°) | 270 |
| 4. Câmara frigorífica | |
| Tempo (horas) | 50 |
| Temperatura (C°) | 6 |
| Humidade (%) | 60 |
| 5. Tostagem | |
| Tempo (min) | 13 |
| Temperatura (C°) | 200 |

Figura 5: Descrição das características específicas das etapas de elaboração dos *croutons* de *C.vulgaris*.



Figura 6 – Arrefecimento das barras de pão



Figura 7 – Arrefecimento dos *croutons*



Figura 8 – Tostagem dos *croutons*

7.4. Prova organolética

Segundo a Norma Portuguesa 4263 (1994), a análise sensorial é o “exame das características organoléticas de um produto pelos órgãos dos sentidos” e é uma ferramenta fulcral para a indústria alimentar, visto que o consumidor atual é cada vez mais exigente e informado e dá mais importância às características sensoriais dos produtos. Por isso, no desenvolvimento de novos produtos é essencial conhecer a aceitabilidade do consumidor, pois o objetivo principal de uma empresa é conseguir vender os produtos que produz.

Uma vez que nunca tinha sido desenvolvido nenhum produto na Rialto® com incorporação de microalgas, foi necessário perceber a sua aceitação. Nesse sentido foi realizada uma prova organolética com colaboradores. Neste trabalho, o método de prova de aceitação utilizado foi o teste de preferências de escala hedónica. É um teste subjetivo que avalia a aceitação dos produtos pelos consumidores. As sete amostras foram apresentadas a todos os provadores de forma aleatória, mas reproduzível entre eles. Para a realização das provas de aceitação, as amostras foram codificadas com uma letra e dois dígitos numéricos, exemplificando, A01.

Esta é uma metodologia há muito utilizada na área alimentar sendo um dos primeiros métodos utilizados no controlo de qualidade que continua a ser atualmente uma ferramenta de elevada

importância na indústria, uma vez que permite realizar avaliações subjetivas e complexas, em que a metodologia varia de acordo com o objetivo final.

A prova de aceitação foi realizada na Rialto®, uma semana após a sua produção, numa sala isolada de ruído, à temperatura ambiente (25°C), no dia 6 de abril de 2022. Foram recolhidas respostas de 19 colaboradores, e posteriormente foi excluído um colaborador por não ter capacidade de responder ao parâmetro do aroma. Os dados foram recolhidos numa ficha de prova normalmente utilizada nas provas organoléticas realizadas na empresa (Anexo B). Estes responderam de acordo com a sua preferência segundo uma escala estabelecida.

Os provadores avaliaram os seguintes atributos:

1. Sabor
2. Aroma
3. Cor
4. Crocância
5. Apreciação global
6. Intenção de compra



Figura 9: Disposição dos *croutons* nas provas organoléticas.

Para a avaliação dos pontos 1 a 5, a escala de valores da ficha de prova utilizava os números de 0 a 5, de acordo com a seguinte designação: 0 – muito desagradável, 1 – desagradável, 2 – um pouco desagradável, 3 – ligeiramente agradável, 4 – agradável e 5 – muito agradável. Para a avaliação do ponto 6, a escala de valores da ficha de prova utilizava os números de 0 a 4, de acordo com a seguinte classificação: 0 – certamente não compraria, 1 – provavelmente não compraria, 2 – não tenho a certeza se compraria, 3 – provavelmente compraria e 4 – provavelmente compraria.

7.5. Análise microbiológica

Os critérios microbiológicos constituem uma das diversas ferramentas de gestão do risco disponíveis e utilizadas a nível global para garantir a segurança dos géneros alimentícios produzidos pelos operadores das empresas do setor alimentar e disponíveis para consumo.

Os microrganismos patogénicos vegetativos devem ser prontamente destruídos durante o cozimento, devido à sua baixa resistência térmica.(9)

As análises laboratoriais das amostras foram realizadas num laboratório externo. Foi enviada uma amostra de 1 kg de cada formulação, no dia 2 de maio de 2022. Foi solicitada a análise dos seguintes parâmetros:

- Microrganismos a 30 °C

São um conjunto de microrganismos viáveis que se desenvolvem a 30 °C em presença de oxigénio. Inclui todas as células vegetativas e esporos de bactérias, leveduras e bolores. As principais fontes de contaminação são o ambiente, as matérias-primas e a manipulação.

O teor em germes totais é mais elevado no caso do incumprimento das boas práticas de higiene e fabrico, utilização de matérias-primas de má qualidade, quebra da cadeia de frio, deficiente higienização de superfícies, ocorrência de contaminações cruzadas, falha/insuficiente tratamento térmico e uma temperatura/tempo manutenção e/ou conservação não controlados. Perante níveis elevados $> 10^6$ UFC/g é importante identificar a flora predominante para interpretar adequadamente o significado desses teores.

- Bolores e leveduras

Bolores e leveduras são fungos e têm a capacidade de desenvolvimento em condições adversas: baixas temperaturas, acidez, baixa aw. As leveduras são aeróbias facultativas enquanto os bolores são aeróbios estritos. Os esporos dos bolores podem ser resistentes a temperaturas elevadas. A principal fonte de contaminação é a disseminação no meio ambiente, e nos produtos de origem vegetal podem ser transferidos para os alimentos, por contacto com equipamentos contaminados ou por exposição ao ar, podendo ser contaminantes de ingredientes utilizados na preparação. Importantes agentes de alteração estão geralmente associados à deterioração de alimentos ácidos, açucarados, com baixa aw ou fermentados.

- *Salmonella*

A salmonela é amplamente dispersa na natureza, e pode inclusive, estar presente nos equipamentos de fábricas, nas mãos e nas superfícies e utensílios de cozinha. Embora,

tradicionalmente se considerasse que a salmonela estava associada a produtos animais no passado, os produtos frescos também têm sido a fonte de grandes surtos, particularmente recentemente. Também sobrevive bem em alimentos com baixa humidade, como especiarias, que têm sido os veículos para grandes surtos. A contaminação cruzada ocorre quando a salmonela é espalhada de uma fonte contaminada – um alimento contaminado ou um manipulador de alimentos infetado – para outros alimentos ou objetos no ambiente.

A contaminação pode espalhar-se para superfícies de fábrica e equipamentos, bem como superfícies de cozinha e utensílios. Pode ocorrer contaminação cruzada em qualquer ponto do processo alimentar, a partir do manuseamento de animais de estimação ou de animais selvagens, manuseando depois alimentos, utensílios de preparação de alimentos ou outros objetos no ambiente.

Alguns exemplos de alimentos ligados à doença de *Salmonella* incluem carnes, aves, ovos, leite e laticínios, peixe, camarão, especiarias, leveduras, molhos, misturas de bolos, sobremesas recheadas de creme e coberturas que contêm ovo cru, gelatina seca, manteiga de amendoim, cacau, frutas e legumes e chocolate.(142)

- *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma das espécies predominantes no intestino humano e, como parte da flora intestinal normal, algumas destas espécies proporcionam muitos benefícios para a saúde do hospedeiro; por exemplo, impedem a colonização do intestino por agentes patogénicos nocivos. No entanto, existem pequenos grupos de *E. coli*, por vezes referidos como enterovirulente *E. coli*, diarreagénico *E. coli*, ou mais comumente, *e. coli* patogénico, que podem causar doenças diarreicas graves em seres humanos.(142)

A sua presença em géneros alimentares deve-se a contaminações cruzadas a partir de matérias-primas de origem animal e vegetal e do meio ambiente (por exemplo. solo, água, ambientes marinhos). A sua presença indica um incumprimento das boas práticas de higiene, uma cozedura insuficiente ou contaminação cruzada a partir de alimento cru, do pessoal, ou das superfícies em contacto com o alimento, além de insuficiente temperatura e tempo na confeção. A deteção de *E. coli* não é um indicador fiável de que patogénios fecais estejam presentes no alimento e a sua ausência não garante a ausência de patogénios entéricos, no entanto é um bom indicador das boas práticas de higiene.(143)

- *Listeria monocytogenes*

Bacilos anaeróbios facultativos, que se desenvolvem a temperaturas normais de refrigeração, mas que demonstram uma resistência ao calor e aos desinfetantes. As principais fontes de

contaminação são o ambiente, matérias-primas e manipulação. Podem sobreviver nas áreas de processamento de alimentos e no equipamento se forem utilizadas práticas inadequadas de higienização. Em alimentos submetidos a tratamento térmico a detecção de *Listeria spp.* indica cozedura insuficiente ou contaminação posterior, podendo a sua presença ser utilizada como indicador da avaliação do estado de higiene.(143)

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno que causa listeriose, uma importante infecção alimentar.(121) Os patogénicos podem crescer em temperaturas refrigeradas, o que torna este organismo um problema particular para a indústria alimentar.

As fontes de contaminação potenciais incluem os trabalhadores alimentares, o ar de entrada, as matérias-primas e os ambientes de processamento de alimentos. Entre essas, a contaminação pós-processamento nas superfícies de contacto com os alimentos constitui a maior ameaça à contaminação do produto.(142)

- Atividade da água

A disponibilidade de água é medida em termos de atividade da água (a_w). A presença e disponibilidade de água também afetam a capacidade de microrganismos para colonizar alimentos. Retirando a água de um alimento, podem-se controlar ou eliminar processos de deterioração. A água, mesmo que presente, pode ser menos disponibilizada ao adicionar solutos, como açúcar e sal. Quando grandes quantidades de sal ou açúcar são adicionadas aos alimentos, a maioria dos microrganismos são desidratados pelas condições hipertónicas e não pode crescer.(121)

O mínimo a_w em que os microrganismos podem crescer (isto é, a_w abaixo do qual as atividades fisiológicas necessárias para a divisão celular são prejudicadas) é de 0,60. O mínimo para o crescimento da maioria das bactérias é de aproximadamente 0,87, embora as bactérias halofílicas possam crescer a a_w tão baixa como 0,75.(144)

Os alimentos com $a_w < 0,85$ incluem cereais, chocolate, cacau em pó, frutos secos e legumes, ovo em pó, fermentado salsicha seca, farinha, farinha e grãos, ervas, especiarias e condimentos, mel, proteína vegetal hidrolisada em pó, pós de carne, carne seca, leite em pó, massa, manteiga de amendoim, amendoins e frutos secos, fórmula infantil em pó, grãos e sementes (por exemplo, sésamo, melão, abóbora, linhaça).

Alguns microrganismos, incluindo aqueles capazes de causar doenças humanas, são capazes de sobreviver processos de secagem onde o metabolismo é muito reduzido, ou seja, o crescimento não ocorre, mas as células e os esporos vegetativos podem permanecer viáveis por vários meses ou mesmo anos. É imperativo que boas práticas de fabrico, boas práticas de higiene e o plano HACCP, com especial atenção para a prevenção da contaminação e redução

da persistência de agentes patogénicos.(144) Alimentos com baixo teor de aw incluem uma variedade de alimentos consumidos prontos para consumo ou usados como ingredientes noutros produtos, incluindo produtos lácteos secos, leite em pó, fórmulas infantis, caseína, concentrado de proteína de soro de leite, lactose, farinhas, massas, cereais infantis , cereais matinais, cacau em pó, chocolates, doces e outros produtos de confeitaria, ovos em pó secos, macarrão seco, sopas secas, folhas de chá, frutas e vegetais secos, nozes, amendoim, sementes, leguminosas, grãos, ervas, especiarias, condimentos, animais secos alimentos, carne seca e produtos de peixe.(145)

Está bem estabelecido que alimentos de baixa e intermediária aw são periodicamente contaminados com patógenos de origem alimentar. A aw mais baixa não impede a contaminação ou sobrevivência dos patógenos mais comuns; apenas seu crescimento é inibido.(146)

Os produtos de panificação podem ser classificados com base na sua aw como (i) produtos de panificação de baixa humidade com $aw < 0,6$, (ii) produtos de panificação de humidade intermediária com aw entre 0,6 e 0,85 e (iii) produtos de panificação com humidade elevada com $aw > 0,85$ e geralmente entre 0,95 e 0,99.

A maioria dos produtos de panificação são comercializados frescos e armazenados a temperatura ambiente. Além disso, a classificação de produtos com base no seu pH e aw é útil para reconhecer o potencial de deterioração e segurança dos produtos de panificação. A deterioração refere-se a qualquer alteração na condição de um alimento que o torne menos palatável no momento do consumo. Os problemas de deterioração dos produtos de panificação podem ser subdivididos em 1) deterioração física (perda de humidade, envelhecimento), 2) deterioração química (rancidez) e 3) deterioração microbiológica (levedura, bolores, crescimento bacteriano). O problema de deterioração predominante é influenciado por fatores inter-relacionados, especificamente temperatura de armazenamento, humidade relativa, nível de conservantes, pH, material de embalagem e ambiente gasoso ao redor do produto e, mais importante, pelo teor de humidade e aw.(9)

Vários patogénios alimentares, como salmonela (em especiarias, nozes secas, chocolate, manteiga de amendoim e assim por diante *Bacillus cereus* (em grãos de arroz), *Clostridium botulinum* (em mel), certos vírus (vírus da hepatite A em tomates semi-secos) foram detetados com capacidade para sobreviver (mas não crescer) em alimentos e ambientes de baixa humidade por longos períodos de tempo A maioria desses surtos relacionados a alimentos de baixa humidade foram causados por espécies de *Salmonella* e apenas um número muito pequeno de células de *Salmonella* são necessários para causar doença.(147)

As principais medidas para evitar a contaminação cruzada com patógenos como Salmonella incluem a aplicação adequada das BPF (boas práticas de fabrico) e do plano HACCP, combinada com a aplicação rigorosa de limpeza a seco para evitar o crescimento de bactérias no ambiente de processamento e perto da linha de produção.(148)

7.6. Análise nutricional e alegações nutricionais

As análises laboratoriais foram realizadas num laboratório externo tendo sido enviada uma amostra de 1 kg de cada formulação no dia 2 de maio de 2022. Inicialmente foi apenas solicitado ao laboratório a análise do teor proteico de todas as amostras. Após análise deste resultado foi solicitada a análise dos seguintes componentes: valor energético, lípidos, hidratos de carbono, açúcares totais, ácidos gordos saturados, sal, fibra, zinco e vitamina B₁₂.

A vitamina B₁₂ é sintetizada apenas por determinados microrganismos e, portanto, a principal fonte da vitamina são os alimentos de origem animal.(149)

Devido à ingestão insuficiente de vitamina B₁₂ entre os grupos de risco, muitas instituições recomendam o uso de suplementos de vitamina B₁₂ ou alimentos fortificados. O pão seria um bom produto para fortificação com vitamina B₁₂. No entanto, para avaliar o potencial de fortificação do pão, a estabilidade da vitamina ao longo do processo de panificação deveria ser confirmada.

Este estudo teve como objetivo investigar a estabilidade da adição de vitamina B₁₂. Relativamente às perdas, 21% foi perdido nas etapas de cozimento no forno em processos de massa simples. Os resultados encorajam novas pesquisas para obter produtos de panificação com teor adequado de vitamina B₁₂, bem como qualidade aceitável de panificação e sensorial.(149)

7.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa IBM SPSS® Statistics, versão 28.0.0.0. A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvios padrão, ou frequências relativas e absolutas. Para comparar as 7 formulações usou-se o teste de Friedman uma vez que as variáveis tinham uma escala discreta. Como análise posterior, para comparar as 6 formulações com microalgas tendo em consideração a cor da microalga (White ou Honey), a percentagem de incorporação (3%, 5% ou 8%) e o termo de interação entre estes, aplicou-se o teste de ANOVA para medidas repetidas.

7.8. Procedimentos de Segurança Alimentar

De acordo com o definido no Manual da Qualidade e Segurança Alimentar da empresa, o plano HACCP foi revisto, no seguimento da alteração relativa aos *croutons*, bem como o fluxograma do processo que tem como principal objetivo a descrição sistemática e ordenada dos processos, das etapas que os integrem e das suas interações como base de avaliação da possibilidade de ocorrência, aumento ou introdução de perigos para a segurança alimentar. A elaboração e aprovação do estudo HACCP é responsabilidade do Departamento de Qualidade.

Conduziu-se a avaliação e categorização dos perigos e respetivas medidas de controlo a implementar e criaram-se os procedimentos de monitorização dos Pontos de Controlo (PC's) e PCC's.

Ainda na fase de produção da *C.vulgaris* incluída neste trabalho, sabe-se que existe um PCC, a pasteurização. Esta é realizada a uma temperatura mínima de 74°C, durante 6 segundos, impedindo desta forma a sobrevivência de bactérias patogénicas.(107)

8. Resultados e discussão

8.1. Formulações

Após realização de todo o processo de desenvolvimento dos *croutons* de microalgas, obtiveram-se 7 amostras distintas: padrão, W3%, W5%, W8%, H3%, H5% e H8%. Na figura 10 é possível verificar o resultado, nomeadamente o aspeto visual.

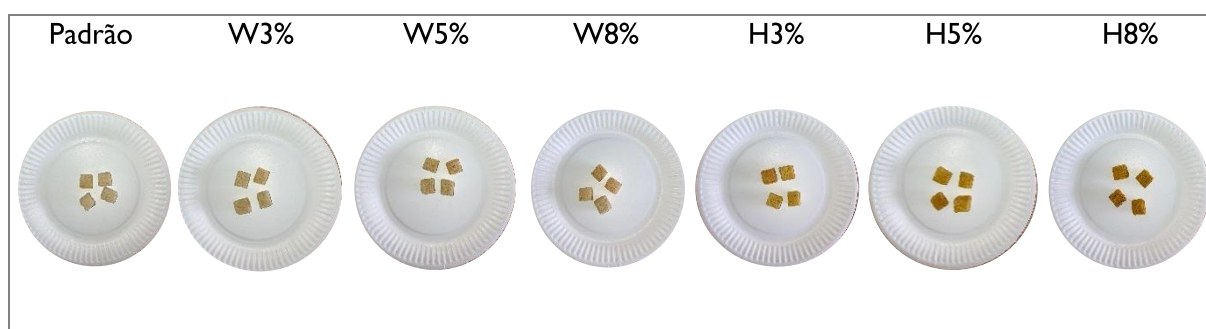


Figura 10: Resultado dos *croutons* desenvolvidos e apresentação dos mesmos nas provas organoléticas.

8.2. Prova organolética

Foram recrutados 19 provadores, 14 do género feminino e 4 do género masculino, com idades compreendidas entre os 21 e os 60 anos, e média de idades de 41 anos. Um dos provadores foi excluído por não ter capacidade de avaliar o aroma, ficando um total de 18 provadores. É possível observar que as formulações de *Chlorella vulgaris* amarela (H3% e H8%) obtiveram a melhor pontuação em todos os atributos em análise, com especial relevância atribuída à apreciação global, onde a formulação H3% obteve uma média de 3.9 pontos e a formulação H8% uma média de 3.8 pontos. O sabor, o aroma, a cor e a intenção de compra foram as qualidades onde as formulações referidas mais se destacaram, face às restantes. Relativamente à formulação H3% a pontuação média obtida nos principais atributos foram: 3.7 pontos no sabor, 3.6 pontos no aroma e 4.4 pontos na cor. Relativamente à formulação H8% a pontuação média obtida nos principais atributos foram: 3.9 pontos no sabor, 3.8 pontos no aroma e 4.4 pontos na cor.

O parâmetro da intenção de compra tem uma importância elevada, pelo facto de ser um dos determinantes que permite prever o interesse dos provadores em adquirir o produto em análise. As formulações com maior pontuação foram mais uma vez as formulações H3% e H8%. A Figura 11 apresenta o diagrama em teia com os resultados obtidos.

Tabela 2: Estatística descritiva (média e desvio padrão) das variáveis analisadas na prova organolética.

| Formulação | Sabor | Aroma | Cor | Crocância | Apreciação Global | Intenção de compra |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|--------------------|
| Padrão | 3,5 ± 0,9 | 3,2 ± 0,8 | 3,2 ± 1,2 | 4,4 ± 0,7 | 3,5 ± 0,9 | 2,2 ± 1,3 |
| H3% | 3,7 ± 1,0 | 3,7 ± 1,0 | 4,4 ± 0,9 | 4,5 ± 0,7 | 3,9 ± 0,7 | 3,1 ± 1,0 |
| H5% | 3,7 ± 0,8 | 3,7 ± 0,8 | 4,4 ± 0,8 | 4,6 ± 0,7 | 3,8 ± 0,8 | 2,9 ± 1,1 |
| H8% | 3,9 ± 1,1 | 3,8 ± 1,0 | 3,7 ± 1,0 | 4,6 ± 0,8 | 3,8 ± 1,0 | 3,1 ± 1,3 |
| W3% | 3,2 ± 0,9 | 3,2 ± 0,6 | 3,4 ± 1,0 | 4,4 ± 0,6 | 3,4 ± 0,8 | 2,1 ± 1,1 |
| W5% | 3,1 ± 1,0 | 3,1 ± 1,0 | 3,3 ± 1,1 | 4,4 ± 0,6 | 3,6 ± 0,9 | 2,4 ± 1,0 |
| W8% | 3,1 ± 1,0 | 3,2 ± 1,0 | 3,6 ± 0,9 | 4,4 ± 0,9 | 3,2 ± 1,0 | 2,6 ± 1,3 |

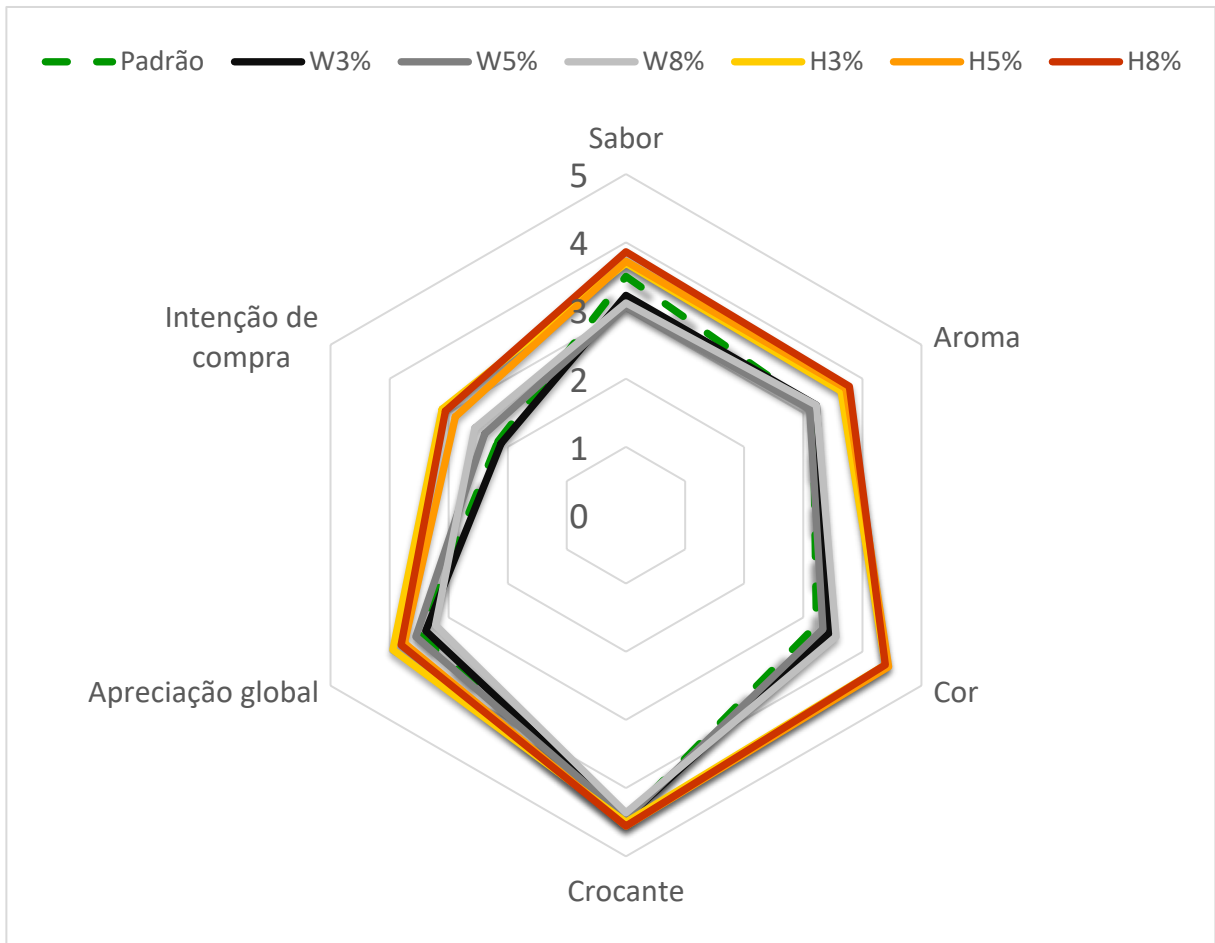


Figura 11: Diagrama em teia com os resultados das provas organoléticas.

Na figura 12 encontram-se os gráficos relativos aos parâmetros avaliados nas provas organoléticas. As pontuações mais elevadas destacam-se nas formulações de *Chlorella vulgaris* amarela (H3%, H5% e H8%)



Figura 12: Gráficos com os resultados das provas organoléticas de cada formulação.

Na análise posterior, comparando as 6 formulações com microalga encontraram-se apenas diferenças significativas tendo em consideração a cor da microalga (*White* ou *Honey*), nas variáveis sabor ($p=0,001$), aroma ($p=0,005$), cor ($p=0,004$), apreciação global ($p=0,007$) e

intenção de compra ($p=0,006$). Apenas na variável crocância não se observaram diferenças significativas ($p=0,204$) tendo em consideração a comparação da cor da microalga. E não se encontraram diferenças significativas entre as formulações quanto à percentagem de incorporação nem na interação entre cor e percentagem de incorporação em nenhuma das variáveis.

8.3. Análise microbiológica

Por serem ricos em nutrientes, os alimentos são um bom ambiente para o crescimento de microrganismos. Este crescimento microbiano é controlado por fatores relacionados com o próprio alimento, designados fatores intrínsecos, e também pelo ambiente onde os alimentos são armazenados.(121)

Os fatores intrínsecos ou relacionados com os alimentos incluem o pH, humidade, atividade da água, potencial de reações redução-oxidação, estrutura física dos alimentos, nutrientes disponíveis e a presença de possíveis agentes antimicrobianos naturais. Os fatores extrínsecos ou ambientais incluem a temperatura, humidade relativa, gases, bem como os tipos e números de microrganismos presente na comida.

A composição em nutrientes é um fator intrínseco crítico. Se um alimento é composto principalmente por hidratos de carbono, predomina o crescimento de fungos e a deterioração resulta em grandes odores. Assim, alimentos como pães, compotas e alguns frutos mostram primeiramente a deterioração pelo crescimento de fungos.(121)

Todos os resultados nas análises microbiológicas (tabela 3) se encontravam adequados.(143)

Tabela 3: Resultados da análise aos parâmetros microbiológicos da formulação selecionada (H8% - Incorporação de 8% *Chlorella vulgaris* Honey)

| Parâmetro | Resultado |
|---|-------------------------|
| Quantificação de microrganismos a 30°C | < 10 ² UFC/g |
| Quantificação de Bolores | < 10 UFC/g |
| Quantificação de Leveduras | < 10 UFC/g |
| Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i> | Não Detetado /25g |
| Quantificação de <i>Escherichia coli</i> | < 10 UFC/g |
| Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> | Não Detetado /25g |

8.4. Análise nutricional e alegações nutricionais

Após a primeira análise nutricional, obtiveram-se os seguintes resultados (Tabela 4), relativamente ao valor de proteína por 100 gramas, de cada formulação. Após a 1ª análise, foi selecionada a formulação H8% para uma análise nutricional mais completa (Tabela 5).

Tabela 4: Resultados da primeira análise nutricional ao teor proteico de todas as formulações.

| Formulação | gr proteína por 100g ± (incerteza) |
|------------|------------------------------------|
| Padrão | 12,2 ± 0,98 |
| W3% | 12,8 ± 1,0 |
| W5% | 13,3 ± 1,1 |
| W8% | 13,5 ± 1,1 |
| H3% | 12,9 ± 1,0 |
| H5% | 13,0 ± 1,1 |
| H8% | 14,2 ± 1,1 |

Tabela 5: Resultados da análise nutricional da formulação selecionada (H8% - Formulação com 8% de *Chlorella vulgaris* Honey).

| Parâmetro | Resultado (por 100g) |
|---------------------------------------|----------------------|
| Valor energético (KJ) | 1687,00 |
| Valor energético (Kcal) | 400,00 |
| Lípidos (g) | 7,15 |
| Dos quais ácidos gordos saturados (g) | 0,96 |
| Hidratos de Carbono (g) | 66,7 |
| Dos quais açúcares (g) | 2,15 |
| Proteína (g) | 14,30 |
| Fibra (g) | 5,70 |
| Sal (g) | 1,06 |
| Zinco (mg) | 2,40 |
| Vitamina B12 | <0,001 |

Relativamente à inclusão de alegações nutricionais ou de saúde nos rótulos dos géneros alimentícios, esta deverá respeitar o disposto no Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Dezembro de 2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos (69) e o Regulamento (UE) n.º 1047/2012 da

Comissão, de 8 de novembro de 2012 que altera o anterior no que se refere à lista de alegações nutricionais.(150)

Com base nestes regulamentos e de acordo com a análise da composição nutricional da formulação H8%, é possível incluir as seguintes alegações:

1. Baixo teor de gorduras saturadas
2. Sem adição de açúcares
3. Fonte de fibra
4. Fonte de proteína

1. Uma alegação de que um alimento é de baixo teor de gordura saturada, ou qualquer alegação que possa ter o mesmo significado para o consumidor, só pode ser feita se a soma dos ácidos gordos saturados e dos ácidos gordos trans contidos no produto não exceder 1,5 g/100 g para os sólidos ou 0,75 g/100 ml para os líquidos; em qualquer dos casos, a soma dos ácidos gordos saturados e dos ácidos gordos trans não pode fornecer mais de 10% do valor energético. A análise nutricional da formulação H8%, revelou que a quantidade de gordura saturada por 100g foi de 0,96 gramas.

2. Uma alegação de que não foram adicionados açúcares ao alimento, ou qualquer alegação que possa ter o mesmo significado para o consumidor, só pode ser feita quando o produto não contiver quaisquer monossacáridos ou dissacáridos adicionados, nem qualquer outro alimento utilizado pelas suas propriedades edulcorantes. Caso os açúcares estejam naturalmente presentes no alimento, o rótulo deve também ostentar a seguinte indicação: “Contém açúcares naturalmente presentes”. Na lista de ingredientes da formulação H8% não consta qualquer monossacárido ou dissacárido adicionado.

3. Uma alegação de que um alimento é uma fonte de fibra, ou qualquer alegação que possa ter o mesmo significado para o consumidor, só pode ser feita quando o produto contiver, no mínimo, 3 g de fibra por 100 g ou, pelo menos, 1,5 g de fibra por 100 kcal. A análise nutricional da formulação H8%, revelou que a quantidade de fibra é de 5,70 gramas por 100g.

4. Uma alegação de que um alimento é uma fonte de proteína, ou qualquer alegação que possa ter o mesmo significado para o consumidor, só pode ser feita quando, pelo menos, 12% do valor energético do alimento for fornecido por proteína. Foi realizado o cálculo relativo à contribuição do valor energético da proteína na formulação H8%, cujo resultado foi igual a 14,3%.

Tendo em conta a informação nutricional da formulação H8%, é possível obter uma parte do rótulo, com a informação nutricional simplificada. Na figura 13 encontram-se 2 modelos

distintos e ambos usados nos produtos alimentares embalados, à venda em Portugal, o *nutri-score* e o semáforo nutricional.



Figura 13: Rotulagem simplificada dos *croutons* H8% (Nutri-score e semáforo nutricional).

No Regulamento UE 1169/2011, capítulo IV, artigo 9º, constam as menções obrigatórias do rótulo alimentar:

- a) Denominação do género alimentício
- b) Lista de ingredientes
- c) Ingredientes ou auxiliares tecnológicos ou derivados de uma substância ou produto que provoquem alergias ou intolerâncias
- d) Quantidade de determinados ingredientes ou categorias de ingredientes
- e) Quantidade líquida do género alimentício
- f) Data de durabilidade mínima ou a data-limite de consumo
- g) Condições especiais de conservação e/ou as condições de utilização
- h) Nome ou a firma e o endereço do operador da empresa do setor alimentar
- i) País de origem ou o local de proveniência
- j) Modo de emprego
- k) Título alcoométrico
- l) Declaração nutricional

Por fim, foi elaborada a ficha técnica dos *croutons* H8% (Anexo C), que deve ser usada com o objetivo de apresentar deste produto, quer ao nível da rotulagem, como também da segurança alimentar.

9. Análise crítica e perspectivas futuras

Ao longo da realização do estágio e do desenvolvimento do trabalho surgiram, naturalmente, alguns desafios e imprevistos que obrigaram a algumas adaptações. A ideia inicial passou por desenvolver um produto diferenciado relativamente aos que já eram produzidos na empresa, quer na sua forma como nos principais ingredientes. Face a várias vicissitudes que foram ocorrendo ao longo dos meses como atrasos na chegada de matéria-prima e de novas máquinas, não foi possível prosseguir com a totalidade da ideia inicial. Se por um lado, foi possível usar uma matéria-prima diferenciada, por outro lado, o tipo de produto não foi o que estava inicialmente planeado, que seria diferente do que habitualmente já é produzido na empresa. Outro desafio que acabou por surgir em fevereiro, e que levou a que os testes fossem realizados numa escala mais reduzida face ao que estava inicialmente delineado, esteve relacionado com a guerra entre a Rússia e a Ucrânia. Como consequência, as matérias-primas, nomeadamente o óleo e a farinha de trigo, foram sendo mais difíceis de adquirir e houve necessidade de gerir o *stock* destes produtos que existia na empresa. Nesse sentido não foi possível fazer os testes em larga escala, onde as quantidades de farinha não seriam de 5kg mas sim 100kg.

Face ao período considerado para o desenvolvimento dos *croutons* de *Chlorella vulgaris*, não foi possível fazer o estudo de validade completo dos mesmos, uma vez que este estudo levaria alguns meses. Quanto às análises nutricionais realizadas, teria sido interessante verificar a presença de outros micronutrientes, tais como vitaminas B1 e B2, vitaminas E e C assim como o perfil lipídico mais completo (ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados, nomeadamente, ómega-3, 6 e 9). O principal fator para a sua não realização no presente trabalho está relacionado com o custo acrescido que estas análises teriam.

Relativamente à receita usada nas formulações e tendo em conta o objetivo de criar um produto com características nutricionais otimizadas, seria interessante substituir o óleo por azeite, o que permitiria obter um melhor perfil lipídico. Adicionalmente, em futuras experiências e reformulações da receita, poderão ser usadas diferentes incorporações de microalgas, para perceber a sua aceitação e conhecer as características nutricionais dos produtos com uma maior quantidade de microalgas.

Embora a incorporação de biomassa de microalgas em produtos tradicionais tenha encontrado vários desafios no passado, principalmente por causa de sua cor intensa ou sabor e odor a peixe, vários estudos demonstraram que as microalgas podem ser incorporadas em produtos alimentares com elevada qualidade físico-química, nutricional e sensorial. Tal é de facto

pretendido, pois segundo o último relatório (2021) da FoodDrink Europe, os principais fatores que influenciam a compra de alimentos dos consumidores europeus são o sabor (45%) e a segurança alimentar (42%).(151)

As microalgas podem ser vistas como um ingrediente novo ou moderno, são um recurso valioso e têm potencial para se tornar um alimento comum para consumidores em todo o mundo. De facto, a forma mais popular de consumir microalgas continua a ser como suplemento nutricional em comprimidos, cápsulas ou em pó. No entanto, essa tendência está a mudar e gradualmente a atual lista de produtos comercializados com incorporação de biomassa de microalgas e lançados no mercado está a ampliar. Apesar dos desafios do cultivo em larga escala, há uma clara necessidade de incorporar ingredientes de microalgas em alimentos. É relevante considerar que também de acordo com o relatório da FoodDrink Europe, o setor dos biscoitos é um dos dez setores de alimentos mais inovadores no mundo. Para além de todo o conhecimento existente até ao momento, são necessários ainda mais estudos para compreender todo o potencial deste recurso como alimento, nomeadamente, a caracterização do conteúdo bioquímico, os seus reais benefícios na saúde e possíveis preocupações relativas ao seu consumo. Deve ser tido em consideração que o consumo excessivo de produtos que contenham extratos ou microalgas inteiras pode causar um efeito negativo em alguns casos raros. No entanto, no global, os resultados sugerem um futuro promissor para a inclusão das microalgas na indústria de alimentos e as expectativas mantêm-se elevadas.(43,111)

A competitividade das microalgas em relação a outras fontes no mercado é um fator crítico que determinará a sua viabilidade comercial.(38) Comparativamente a outras matérias-primas, as microalgas têm um custo (preço/kg) elevado, o que poderá levar a obstáculos na sua inclusão. Contudo, o aumento da sua utilização permitirá a compra a um preço mais competitivo e poderá tornar-se uma matéria-prima cada vez mais competitiva.

As microalgas são pequenas fábricas e fontes renováveis, sustentáveis e económicas de biocombustíveis, medicamentos bioativos e ingredientes alimentares. (35) Provavelmente, há mais espécies de algas que não foram identificadas do que aquelas que foram. Portanto, o seu potencial de uso para consumo de alimentos, suplementos, produção de energia e muito mais, intensificar-se-á naturalmente nos próximos anos.(43)

A segurança dos alimentos é uma questão complexa que envolve muitas variáveis inter-relacionadas (9) e sendo inquestionável que qualquer produto colocado no mercado tem de ser comprovadamente seguro para os consumidores, cada vez existirá maior exigência na

inovação do setor alimentar e as indústrias devem estar preparadas para desenvolver processos adequados.

A segurança alimentar global enfrenta inúmeros desafios como o crescimento contínuo da população humana. No século XXI, os desafios vão continuar a centrar-se no aumento da segurança alimentar global, com alimentos seguros e nutritivos (11) sendo que os agricultores, os consumidores, os investigadores, as agências governamentais e os grupos de defesa dos consumidores desempenham um papel importante na influência das políticas de segurança alimentar e das práticas sustentáveis de produção alimentar. Também as classes de profissionais de saúde podem assumir a responsabilidade de sensibilizar e fornecer informações que permitam às partes interessadas tomar decisões orientadas sobre as práticas alimentares, e decretar políticas e orientações que protejam a segurança alimentar e protejam a sustentabilidade ambiental. Existem também as preocupações e necessidades por parte do consumidor que procura determinadas características nos produtos que vai consumir, nomeadamente a garantia da qualidade, da segurança alimentar e a relação com a sua saúde. Destaca-se também a crescente preocupação do consumidor pela sustentabilidade das suas escolhas, procurando produtos que respeitem os ecossistemas e o ambiente, bem como opções menos poluentes e biodegradáveis. (8) Pode considerar-se que o aumento da procura por alimentos seguros tem o potencial de melhorar globalmente a segurança alimentar, a nutrição e o bem-estar económico.(11)

A educação continuada em higiene e segurança alimentar para os trabalhadores da indústria agroalimentar, manipuladores de alimentos e também o público em geral é também um componente crítico no combate contra doenças transmitidas por alimentos. A implementação de um programa HACCP mostra-se essencial para minimizar a contaminação e a disseminação de doenças transmitidas por alimentos.(9)

10. Conclusão

O trabalho realizado ao longo do estágio na Rialto® permitiu desenvolver um produto alimentar inovador para a empresa, sobretudo ao nível da principal matéria-prima.

As análises microbiológicas e nutricionais apresentaram resultados muito satisfatórios, permitindo atingir os objetivos delineados inicialmente, uma vez que foi possível associar uma alegação relativa ao teor de proteína e que todos os resultados da análise microbiológica mostraram que os *croutons* cumpriram todos os parâmetros da segurança alimentar desejados.

A prova organolética demonstrou que as formulações de *C.vulgaris* de cor amarela tiveram uma aceitação maior pelos provadores, o que leva a concluir que no futuro esta microalga deve ser a aposta principal para novos produtos a serem comercializados pela empresa.

Concluindo, foi possível inovar e criar um produto alimentar diferenciado, com as características nutricionais e microbiológicas desejadas, com a perspectiva de que no futuro a microalga *Chlorella vulgaris* seja incorporada em vários produtos alimentares.

11. Referências bibliográficas

- (1) ACHTEN, E. [et al. .] - Instituto Federal Alemão de Avaliação de Riscos - Feed and food safety in times of global production and trade. BfR Wissenschaft, 2021.
- (2) CHACÓN-LEE, T.L; GONZÁLEZ-MARIÑO, G.E. Microalgae for “Healthy” Foods- Possibilities and Challenges. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2010;9(6):655–75.
- (3) FERNÁNDEZ, FGA. [et al. .] The role of microalgae in the bioeconomy. New Biotechnology, 2021;61:99–107.
- (4) FUNG, F; WANG. HS; MENON. S. Food safety in the 21st century. Biomed J. 2018 (2); 4:88–95.
- (5) PUTNIK P. [et al. .] Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. Foods. 2018;7(7):1–16.
- (6) CAPORGNO, MP; MATHYS A. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. Front Nutr. 2018;5 (July):1–10.
- (7) GRANATO D. [et al. .] Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. 2019;1–26.
- (8) PORTUGAL - Sociedade Portuguesa de Inovação - Portugal Foods. Roadmap Tecnológico para o setor agroalimentar português. Dezembro 2020.
- (9) SMITH, JP. [et al. .] Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products - A Review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004;44(1):19–55.
- (10) FRITSCHÉ J. Recent Developments and Digital Perspectives in Food Safety and Authenticity. J Agric Food Chem. 2018;66(29):7562–7.
- (11) GARCIA, SN; OSBURN, BI; JAY-RUSSELL, MT; One Health for Food Safety, Food Security, and Sustainable Food Production. Front Sustain Food Syst. 2020;4(January):1–9.
- (12) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety is everyone’s business. Junho 2019. [Acedido a 25 de março de 2022]. Disponível na internet: <https://www.who.int/news/item/06-06-2019-food-safety-is-everyones-business>.
- (13) WELLS ML, et al. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. J Appl Phycol. 2017;29(2):949–82.
- (14) SMITH AG, TREDICI MR, BOUSSIBA S. What are Algae? Eur Algae Biomass Assoc. 2019;(June):1–11.
- (15) PETER AP, et al. Microalgae for biofuels, wastewater treatment and environmental monitoring. 2021;19:2891–904.

- (16) EPPINK MHM, *et al.* From current algae products to future biorefinery practices: A review. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2019;166:99–123.
- (17) FERNANDEZ F, *et al.* Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96(3):577–86.
- (18) ACIÉN FG, *et al.* Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(21):9013–22.
- (19) LOKE SP. Global market and economic analysis of microalgae technology: Status and perspectives. *Bioresour Technol.* 2022;357(April):127329.
- (20) ROY W, *et al.* . Microalgae-based bioplastics: Future solution towards mitigation of plastic wastes. *Environ Res.* 2022 Apr 15;206:112620.
- (21) CHONG W, *et al.* . Advances in production of bioplastics by microalgae using food waste hydrolysate and wastewater: A review. *Bioresour Technol.* 2021 Dec 1;342:125947.
- (22) CHONG W, *et al.* Recent advances on food waste pretreatment technology via microalgae for source of polyhydroxyalkanoates. *J Environ Manage.* 2021 Sep 1;293:112782.
- (23) REHAN M, *et al.* . MINI REVIEW Microalgae: The Future Supply House of Biohydrogen and Biogas. 2021;
- (24) ÖZÇİMEN D, İNAN B, KOÇER AT, VEHAPI M. Bioeconomic Assessment of Microalgal Production. In: *Microalgal Biotechnology.* 2018. p. 195–213.
- (25) LIU J, CHEN F. Biology and industrial applications of *Chlorella*: Advances and prospects. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2016;153:1–35.
- (26) FERREIRA. A, *et al.* Future perspectives of microalgae in the food industry. *Cultured Microalgae for the Food Industry: Current and Potential Applications.* 2021. 387–433 p.
- (27) MARTÍN-GIRELA. *et al.* Screening of contaminants of emerging concern in microalgae food supplements. *Separations.* 2020;7(2).
- (28) BECKER EW. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv.* 2007;25(2):207–10.
- (29) EJIKÉ C, *et al.* Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends Food Sci Technol.* 2017;59:30–6.
- (30) ORDEM DOS NUTRICIONISTAS. Ato do Nutricionista. Portugal: Diário da República; 2022 p. 696–7.

- (31) ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE NUTRIÇÃO. Áreas de Atuação do Nutricionista - Tecnologia alimentar/Ciência dos alimentos [Internet]. [cited 2022 May 4]. Available from: <https://www.apn.org.pt/ver.php?cod=0c0b0d>
- (32) THE CONSUMER GOODS FORUM - GFSi. IFS - International Featured Standards gains GFSI Recognition for IFS Food, IFS Broker, IFS Logistics and IFS PACsecure [Internet]. 2021 [cited 2022 May 4]. Available from: https://mygfsi.com/press_releases/ifs-international-featured-standards-gains-gfsi-recognition-for-ifs-food-ifs-broker-ifs-logistics-and-ifs-pacsecure/
- (33) SGS PORTUGAL - Sociedade Geral de Superintendência S.A. GFSI Certification [Internet]. Disponível na Internet: <https://www.sgs.pt/en/agriculture-food/food/gfsi-certification>
- (34) PARLAMENTO EUROPEU; Conselho da União Europeia. Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento. J Of da União Eur. 2011;L 304:18–63.
- (35) KHAN MI, SHIN JH, KIM JD. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact.* 2018;17(1):1–21.
- (36) DANESHVAR E, et al. . Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresour Technol.* 2021;329.
- (37) SANDGRUBER F, et al. . Variability in macro-and micronutrients of 15 commercially available microalgae powders. *Mar Drugs.* 2021;19(6):1–23.
- (38) BLEAKLEY S, HAYES M. Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production. *Foods.* 2017;6(5):1–34.
- (39) AMBATI RR, et al. . Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(12):1880–902.
- (40) SCHÜLER L, et al. . Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants With Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8(May):1–10.
- (41) ZHANG J, et al. Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health. *Food Funct.* 2014;5(3):413–25.
- (42) LENA G, et al. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. *Food Res Int.* 2019 Jun 1;120:810–8.

- (43) M. BISHOP W, M. ZUBECK H. Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *J Nutr Food Sci.* 2012;02(05).
- (44) SPOLAORE P, JOANNIS-CASSAN C, DURAN E, ISAMBERT A. Commercial Applications of Microalgae. *J Biosci Bioengineering.* 2006;508:87–96.
- (45) VÁZQUEZ-ROMERO B, PERALES JA, PEREIRA H, BARBOSA M, RUIZ J. Techno-economic assessment of microalgae production, harvesting and drying for food, feed, cosmetics, and agriculture. *Sci Total Environ.* 2022;837(January).
- (46) ARAÚJO R, *et al.* . Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Front Mar Sci.* 2021;7(January):1–24.
- (47) NICCOLAI A, CHINI ZITTELLI G, RODOLFI L, BIONDI N, TREDICI MR. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Res.* 2019;42(April).
- (48) SIDARI R, TOFALO R. A Comprehensive Overview on Microalgal-Fortified/Based Food and Beverages. *Food Rev Int.* 2019;35(8):778–805.
- (49) EUFIC. Microalgae: producing new food products that consumers accept [Internet]. Eufic - food facts for healthy choices. 2022 [cited 2022 Jun 25]. Available from: <https://www.eufic.org/en/food-production/article/microalgae-producing-new-food-products-that-consumers-accept>
- (50) BEHESHTIPOUR H, *et al.* Supplementation of spirulina platensis and chlorella vulgaris algae into probiotic fermented milks. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2013;12(2):144–54.
- (51) COX DN, EVANS G, LEASE HJ. The influence of product attributes, consumer attitudes and characteristics on the acceptance of: (1) Novel bread and milk, and dietary supplements and (2) fish and novel meats as dietary vehicles of long chain omega 3 fatty acids. *Food Qual Prefer.* 2011 Mar 1;22(2):205–12.
- (52) GRAHL S, STRACK M, WEINRICH R, MÖRLEIN D. Consumer-Oriented Product Development: The Conceptualization of Novel Food Products Based on Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Resulting Consumer Expectations. *J Food Qual.* 2018;2018.
- (53) GRAHL S, STRACK M, MENSCHING A, MÖRLEIN D. Alternative protein sources in Western diets: Food product development and consumer acceptance of spirulina-filled pasta. *Food Qual Prefer.* 2020;84:103933.
- (54) URALA N, LÄHTEENMÄKI L. Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods. *Food Qual Prefer.* 2004;15(7-8 SPEC.ISS.):793–803.
- (55) VERBEKE W. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for

- health? *Food Qual Prefer.* 2006 Jan 1;17(1-2):126-31.
- (56) MOONS I, BARBAROSSA C, DE PELSMACKER P. The Determinants of the Adoption Intention of Eco-friendly Functional Food in Different Market Segments. *Ecol Econ.* 2018;151(November 2017):151-61.
- (57) FRADIQUE MÓNICA, *et al.* Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part I: Preparation and evaluation. *J Sci Food Agric.* 2010;90(10):1656-64.
- (58) GOUVEIA L, *et al.* *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2007 Sep 1;8(3):433-6.
- (59) BATISTA AP, *et al.* Microalgae biomass as a novel functional ingredient in mixed gel systems. *Gums Stabilisers Food Ind* 14. 2008;(January):487-94.
- (60) GOUVEIA L, *et al.* *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *Eur Food Res Technol.* 2006;222(3-4):362-7.
- (61) GOUVEIA L, *et al.* Microalgae in novel food products. *Algae: Nutrition, Pollution Control and Energy Sources.* 2008. 265-300 p.
- (62) ELTANAHY E, TORKY A. CHAPTER 1. Microalgae as Cell Factories: Food and Feed-grade High-value Metabolites. In: *Microalgal Biotechnology.* 2021. p. 1-35.
- (63) CAPEK P, *et al.* *Chlorella vulgaris* α -L-arabino- α -L-rhamno- α , β -D-galactan structure and mechanisms of its anti-inflammatory and anti-remodelling effects. *Int J Biol Macromol.* 2020;162:188-98.
- (64) CHENG C, *et al.* . Effects of *Chlorella* on Activities of Protein Tyrosine Phosphatases, Matrix Metalloproteinases, Caspases, Cytokine Release, B and T Cell Proliferations, and Phorbol Ester Receptor Binding. *J Med Food.* 2004;7(2):146-52.
- (65) MERCHANT RE, *et al.* Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for mild to moderate hypertension. *J Med Food.* 2002;5(3):141-52.
- (66) MERCHANT RE, *et al.* Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for patients with fibromyalgia syndrome: A pilot study. *Phyther Res.* 2000;14(3):167-73.
- (67) TIBERG E. *et al.* Allergy to green algae (*Chlorella*) among children. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;96(2):257-9.
- (68) VETTORAZZI A, *et al.* European regulatory framework and safety assessment of food-related bioactive compounds. *Nutrients.* 2020;12(3):1-16.
- (69) PARLAMENTO EUROPEU, Conselho da União Europeia. Regulamento (Ce) N. 1924/2006 - consolidado 2014. *J Of da União Eur.* 2006;L404(20 de Dezembro):1-76.
- (70) LENSSEN KGM, BAST A, DE BOER A. Clarifying the health claim assessment procedure

- of EFSA will benefit functional food innovation. *J Funct Foods*. 2018;47(May):386–96.
- (71) BATISTA AP, *et al.* Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. *Food Hydrocoll.* 2006;20(1):44–52.
- (72) BATISTA AP, *et al.* . Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Res.* 2017 Sep 1;26:161–71.
- (73) SINGH P, *et al.* Optimization of a process for high fibre and high protein biscuit. *J Food Sci Technol.* 2015;52(3):1394–403.
- (74) EL BAKY HHA, EL BAROTY GS, IBRAHEM EA. Functional characters evaluation of biscuits sublimated with pure phycocyanin isolated from *Spirulina* and *Spirulina* biomass. *Nutr Hosp.* 2015;32(1):231–41.
- (75) JAWAD M, *ET AL.* Perfil de eficacia y seguridad de *Echinacea purpurea* en la prevención de episodios de resfriado común: Estudio clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. *Rev Fitoter.* 2013;13(2):125–35.
- (76) FINNEY KF, POMERANZ Y, BRUINSMA BL. Use of algae *Dunaliella* as protein supplement in bread.pdf. Vol. 61, *Cereal Chemistry*. 1984. p. 402–6.
- (77) LIANG S, LIU X, FENGCHEN, CHEN Z. Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiologia.* 2004;
- (78) BATISTA AP, *et al.* Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Res.* 2013;2(2):164–73.
- (79) KRATZER R, Murkovic M. Food ingredients and nutraceuticals from microalgae: Main product classes and biotechnological production. *Foods.* 2021;10(7).
- (80) SAFI C, *et al.* Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2014;35:265–78.
- (81) RODRIGUEZ-GARCIA I, GUIL-GUERRERO JL. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem.* 2008;108(3):1023–6.
- (82) JANCZYK P, WOLF C, SOUFFRANT WB. Evaluation of nutritional value and safety of the green microalgae *Chlorella vulgaris* treated with novel processing methods. *Arch Zootech.* 2005;8(January):132–47.
- (83) ALLMICROALGAE. Honey & White *Chlorella vulgaris* [Internet]. 2021 [cited 2022 May 31]. Disponível na internet: <https://www.allmicroalgae.com/pt-pt/2020/05/19/honey-white-chlorella-vulgaris/>

- (84) EUROPEAN COMMISSION. Consultation request for the determination of the novel food status - *Chlorella* sp. (*Chlorella vulgaris*) - Regulation (EU) 2015/2283. 2022.
- (85) ALLMICROALGAE. New-look microalgae: Bright future for light-coloured *Chlorella*. 2021. Disponível na internet: <https://www.allmicroalgae.com/pt-pt/2021/03/25/new-look-microalgae-bright-future-for-light-coloured-chlorella/>
- (86) ALLMICROALGAE - Natural products. O Nosso Processo: Microalgas. Disponível na internet <https://www.allmicroalgae.com/pt-pt/o-nosso-processo-microalgas/>
- (87) PINA-PÉREZ MC, RIVAS A, MARTÍNEZ A, RODRIGO D. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. 2021;(January).
- (88) GRAÇA C, *et al.* Impact of *Chlorella vulgaris* on the rheology of wheat flour dough and bread texture. *LWT - Food Sci Technol.* 2018;89 (October 2017):466–74.
- (89) HYRSLOVA I, *et al.* . Functional properties of *chlorella vulgaris*, colostrum, and bifidobacteria, and their potential for application in functional foods. *Appl Sci.* 2021;11(11):1–11.
- (90) RAHMAN M, *et al.* . A Comprehensive Review on Bio-Preservation of Bread: An Approach to Adopt Wholesome Strategies. *Foods.* 2022;11(3).
- (91) KOYANDE K, *ET AL.* Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci Hum Wellness.* 2019;8(1):16–24.
- (92) ANDRADE LM. *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Process Technol.* 2018;6(1):45–58.
- (93) LUCKAKOVA S, BRANYIKOVA I, HAYES M. Microalgal Proteins and Bioactives for Food, Feed, and Other Applications. *Appl Sci.* 2022;12(9).
- (94) FALLAH A, *et al.* . Effect of *Chlorella* supplementation on cardiovascular risk factors: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Nutr.* 2018 Dec 1;37(6):1892–901.
- (95) QIAN H, *et al.* . Contrasting silver nanoparticle toxicity and detoxification strategies in *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*: New insights from proteomic and physiological analyses. *Sci Total Environ.* 2016 Dec 1;572:1213–21.
- (96) LEE I, *et al.* . Detoxification of *chlorella* supplement on heterocyclic amines in Korean young adults. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015 Jan 1;39(1):441–6.
- (97) MEHTA P, *et al.* Biomass and lipid production of a novel freshwater thermo-tolerant mutant strain of *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738 in seawater salinity recycled medium. *Algal Res.* 2018 Dec 1;36:88–95.

- (98) KIM N, *et al.* Effect of Production on Immune-enhancement and Cytokine. 2008;17(5):953–8.
- (99) BATISTA AP, *et al.* Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Res.* 2017;26(July):161–71.
- (100) Associação Portuguesa de Nutrição. Um olhar sobre os sistemas de rotulagem alimentar *Front of Pack.* 2019;
- (101) Zuccaro G, Yousuf A, Pollio A, Steyer JP. Microalgae cultivation systems. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production.* Elsevier Inc.; 2019. 11–29 p.
- (102) Bošnjaković M, Sinaga N. The perspective of large-scale production of algae biodiesel. *Appl Sci.* 2020;10(22):1–26.
- (103) Piwowar A, Harasym J. The importance and prospects of the use of algae in agribusiness. *Sustain.* 2020;12(14):1–13.
- (104) Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2014 Jul 1;35:265–78.
- (105) Nova P, Martins AP, Teixeira C, Abreu H, Silva JG, Silva AM, *et al.* Foods with microalgae and seaweeds fostering consumers health: a review on scientific and market innovations. *J Appl Phycol.* 2020;32(3):1789–802.
- (106) Johnson TJ, Katuwal S, Anderson GA, Gu L, Zhou R, Gibbons WR. Photobioreactor cultivation strategies for microalgae and cyanobacteria. *Biotechnol Prog.* 2018;34(4):811–27.
- (107) Allmicroalgae. Heterotrophic *Chlorella* Powder Production Process Flowchart (Smooth , Yellow and White *Chlorella*) Heterotrophic *Chlorella* Powder Production Process Flowchart (Smooth , Yellow and White *Chlorella*). 2021.
- (108) The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 etc. *Off J Eur Union.* 2015;327(258):1–22.
- (109) Parlamento Europeu, Conselho da União Europeia. Regulamento (CE) N.º 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Janeiro de 1997. *J Of das Comunidades Eur.* 1997;40(43):1–6.
- (110) Smith AG, Tredici MR, Boussiba S, Verdelho V, Cadoret J-P, Davey MP, *et al.* EABA –

- Position Paper – What are Algae? 2019;(June):11.
- (111) LAFARGA T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. *Algal Res.* 2019;41(May):101566.
- (112) EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) No 2017/2470. *Off J Eur Union.* 2017;60(351):72–201.
- (113) Edible seaweed and microalgae - Regulatory status in France and Europe - 2019 update. *Cent d'étude Valoris des algues.* 2020;1–8.
- (114) JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA E-L. Regulamento (CE) N. 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho. 2005 p. 1–54.
- (115) ARAUJO R, PETEIRO C. Algae as food and food supplements in Europe. 2021.
- (116) FoodDrink Europe. FOOD SAFETY - Ensuring safe food for all. 2021. Disponível na internet: <https://www.fooddrinkeurope.eu/policy-area/food-safety/>
- (117) WEAVER CM, *et al.* . Processed foods: contributions to nutrition. Vol. 99, *Am J Clin Nutr.* 2014.
- (118) FAO/WHO Food standards. FAO/WHO Standards - Codex Alimentarius Versão Portuguesa - CAC/RCP 1-1969 Rev. 4 - 2003. 2003;1:56.
- (119) VIEGAS S. Segurança alimentar: guia de boas práticas do consumidor. INSA (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge). 2014.
- (120) CARMONA, P., NABAIS, P. & VASCONCELOS FM. PNCA: evolução histórica até à atualidade. *Riscos e alimentos. Riscos e Aliment.* 2019;17(janeiro):6–30.
- (121) M.WILLEY J, M.SHERWOOD L, J.WOOLVERTON C. PRESCOTT, Harley, and Klein's Microbiology. Seventh Ed. Bruflodt LA, editor. The McGraw-Hill. Colin Wheatley/Janice Roerig-Blong; 284–292 p.
- (122) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food safety - Key facts 2022. Disponível na internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- (123) SILVER L, BASSETT MT. Food safety for the 21st century. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2008;300(8):957–9.
- (124) SICHERER SH, SAMPSON HA. FOOD ALLERGY. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 SUPPL. 2):S116–25.
- (125) Food and Drink Europe. Guidance on Food Allergen Management for Food Manufacturers Version 2. 2022;(March).
- (126) FERNANDEZ A, MILLS ENC, KONING F, MORENO FJ. Allergenicity Assessment of Novel Food Proteins: What Should Be Improved? *Trends Biotechnol.* 2021 Jan 1;39(1):4–8.

- (127) PALI-SCHÖLL I, *et al.* Allergenic and novel food proteins: State of the art and challenges in the allergenicity assessment. *Trends Food Sci Technol.* 2019 Feb 1;84:45–8.
- (128) VERVERIS E, *et al.* . Novel foods in the European Union: Scientific requirements and challenges of the risk assessment process by the European Food Safety Authority. *Food Res Int.* 2020 Nov 1;137:109515.
- (129) BIANCO M, *et al.* A new paradigm to search for allergenic proteins in novel foods by integrating proteomics analysis and in silico sequence homology prediction: Focus on spirulina and chlorella microalgae. *Talanta.* 2022 Apr 1;240:123188.
- (130) TIBERG E, ROLFSEN W, EINARSSON R. Preparation of Allergen Extracts from the Green Alga Chlorella: studies of growth variation, batch variation, and partial purification. *Int Arch Allergy Apply Immunol.* 1990;92:23–9.
- (131) YIM HE, *et al.* Acute tubulointerstitial nephritis following ingestion of Chlorella tablets. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(6):887–8.
- (132) Food Standards Agency. Naturya recalls Organic Chlorella Powder due to undeclared sulphites. <https://www.food.gov.uk/news-alerts/alert/fsa-aa-44-2018>. 2018 May 17;
- (133) ASHWORTH G. Sulphur dioxide in commercially produced microalgae. 2018.
- (134) VAN DER SPIEGEL M, *et al.* Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2013;12(6):662–78.
- (135) RANI K, SANDAL N, SAHOO PK. A comprehensive review on chlorella-its composition, health benefits, market and regulatory scenario. ~ 584 ~ *Pharma Innov J.* 2018;7(7):584–9.
- (136) YOKEL RA. Aluminium toxicokinetics: An updated minireview. *Pharmacol Toxicol.* 2001;88(4):159–67.
- (137) RZYMSKI P *et al.* . Essential and toxic elements in commercial microalgal food supplements. *J Appl Phycol.* 2019;31(6):3567–79.
- (138) IFS International Featured Standards. IFS Food Standard Version 7 - Standard for assessing product and process compliance in relation to food safety and quality. 2020. p. 138.
- (139) FAO; WHO. Codex Alimentarius - International Food Standards. 2020.
- (140) MIL-HOMENS S. O que é HACCP. ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). 2007 . Disponível na internet: <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/alimentos-para-animais/garantir-a-qualidade-e-a-seguranca-dos-alimentos-para-animais/requisitos-de-higiene/haccp/>

- (141) REGULAMENTO (UE) 2017/625 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. Jornal Oficial da União Europeia; 2017.
- (142) LAMPEL KA, AL-KHALDI S, SUSAN MARY CAHILL B., editors. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second edi. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration; 2012.
- (143) SARAIVA. M, *et al.* Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar|Valores-guia. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; 2019.
- (144) BEUCHAT LR, *et al.* . Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. J Food Prot. 2013;76(1):150–72.
- (145) CORDIER J-L. Methodological and Sampling Challenges to Testing Spices and Low-Water Activity Food for the Presence of Foodborne Pathogens. In: Gurtler JB, Doyle MP, Kornacki JL, editors. The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices. Springer, New York; 2014. p. 367–86.
- (146) GURTLER JB. Challenges in recovering foodborne pathogens from low-water-activity foods. J Food Prot. 2019;82(6):988–96.
- (147) SYAMALADEVI RM, Influence of Water Activity on Thermal Resistance of Microorganisms in Low-Moisture Foods: A Review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2016;15(2):353–70.
- (148) BREEUWER P. Adaptation of Pathogenic Microorganisms to Dry Conditions. In: Doyle JBG, P. M, Kornacki JL, editors. The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices. Springer, New York; 2014.
- (149) EDELMANN M, *et al.* Stability of added and in situ-produced vitamin B12 in breadmaking. Food Chem. 2016 Aug 1;204:21–8.
- (150) COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) N.º 1047/2012 da comissão de 8 de novembro de 2012. J Of da União Eur. 2012;(4):36–7.
- (151) FoodDrink Europe. FoodDrinkEurope-Data-Trends-2021. 2021.

12. Anexos

Anexo A – Declaração de alérgenos Allmicoralgae®



Allergen Statement

Allmicoralgae's production plant is specifically prepared for microalgae production. Microalgae biomass and powder are the exclusive products resulting of its activity.

For all intents and purposes Algafarm doesn't produce or keep in its premises any of the following items:

- Cereal containing gluten
- Shellfish
- Eggs
- Fish
- Peanuts
- Soy bean
- Milk (including lactose)
- Edible nuts and seeds
- Celery
- Mustard
- Sesame seed
- Lupines
- Molluscs

stated in Regulation (EU) nº1169/2011 as substances or products causing allergies or intolerances.

Although not added in the process, sulfites are naturally present in the product as they are a sub product of the microalgae' metabolism.

Pataias, 15th January 2021



Allmicoralgae - Natural Products, S.A.
NIF 509 651 326
C.A. 50.000 € - Mat. C.R.C. Lisboa
Fede: R. 25 Abril 2445-413 Pataias
PORTUGAL
T. (+351) 21 751 51 51 Fax: info@allmicoralgae.com
Plant Manager

ALLMICROALGAE - NATURAL PRODUCTS, S.A.
Pataias, Portugal

Anexo B – Ficha da prova organolética



AVALIAÇÃO DE PRODUTO

Pág. 1 de 2

____/____/____

Provedor: _____

Amostra: _____

| 1. Sabor | 2. Aroma | 3. Cor | 4. Crocante | 5. Apreciação Global | 6. Intenção de comprar |
|----------|----------|--------|-------------|----------------------|------------------------|
| | | | | | |

Observações: _____

Legenda:
 1) a 5) → 0 – "muito desagradável"; 1 – "desagradável"; 2 – "um pouco desagradável"; 3 – "ligeiramente agradável"; 4 – "agradável"; 5 – "muito agradável".
 6) → 0 – "certamente não compraria"; 1 – "provavelmente não compraria"; 2 – "não tenho certeza se compraria"; 3 – "provavelmente compraria"; 4 – "certamente compraria".

Amostra: _____

| 1. Sabor | 2. Aroma | 3. Cor | 4. Crocante | 5. Apreciação Global | 6. Intenção de comprar |
|----------|----------|--------|-------------|----------------------|------------------------|
| | | | | | |

Observações: _____

Legenda:
 1) a 5) → 0 – "muito desagradável"; 1 – "desagradável"; 2 – "um pouco desagradável"; 3 – "ligeiramente agradável"; 4 – "agradável"; 5 – "muito agradável".
 6) → 0 – "certamente não compraria"; 1 – "provavelmente não compraria"; 2 – "não tenho certeza se compraria"; 3 – "provavelmente compraria"; 4 – "certamente compraria".


Amostra: _____

| 1. Sabor | 2. Aroma | 3. Cor | 4. Crocante | 5. Apreciação Global | 6. Intenção de comprar |
|----------|----------|--------|-------------|----------------------|------------------------|
| | | | | | |

Observações: _____

Legenda:
 1) a 5) → 0 – "muito desagradável"; 1 – "desagradável"; 2 – "um pouco desagradável"; 3 – "ligeiramente agradável"; 4 – "agradável"; 5 – "muito agradável".
 6) → 0 – "certamente não compraria"; 1 – "provavelmente não compraria"; 2 – "não tenho certeza se compraria"; 3 – "provavelmente compraria"; 4 – "certamente compraria".

Anexo C – Ficha técnica Croutons *Chlorella vulgaris*

| | | |
|--|--|-------------------|
|  | <p>Manual de Segurança Alimentar Ficha Técnica de Produto Família II – Croutons Código Do Artigo</p> | |
| <p>DESIGNAÇÃO</p> | <p>CUBOS DE PÃO DE MICROALGAS</p> | |
| <p>DADOS DO FABRICANTE</p> | <p>CARACTERÍSTICAS FÍSICAS</p> | |
| <p>Morada Comercial: Zona Industrial da Palhaça, Lote 4; 3770-355 Palhaça OB Telefone: 234 754 100 Fax: 234 754 101</p> | <p>Cubos de pão de trigo e microalgas tostados, com dimensões aproximadas de 15x15x15mm, provenientes do corte de pão de forma que podem ou não apresentar côdea. Com textura crocante, cor amarela (<i>C. vulgaris Honey</i>) ou branca (<i>C. vulgaris White</i>), cheiro e sabor ligeiro, característico das microalgas.</p> | |
| <p>MENÇÕES DE ROTULAGEM</p> | <p>INGREDIENTES/ALERGÉNIOS</p> | |
| <p>Denominação do produto; Identificação do Fabricante; Lote e Validade; Lista de Ingredientes; Declaração Nutricional; Peso Líquido; Código de Barras; Condições de Conservação; Símbolo Ponto Verde.</p> | <p>Farinha de <i>trigo (glúten)</i> (80%), óleo vegetal de girassol alto oleico, <i>glúten de trigo</i>, sal e levedura. Pode conter vestígios de <i>sementes de sésamo</i>.</p> | |
| <p>ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS</p> | <p>INFORMAÇÃO NUTRICIONAL MÉDIA (100g)</p> | |
| <p>Contagem de Microrganismos a 30°C: $\leq 1 \times 10^2$ ufc/g</p> | <p>Energia: 1687 kJ /400 kcal</p> | |
| <p>Contagem de Bolores e Leveduras: $\leq 1 \times 10$ ufc/g</p> | <p>Lípidos: 7,15 g Dos quais Saturados: 0,96 g</p> | |
| <p>Pesquisa de <i>Salmonella spp</i>: Negativo em 25 g</p> | <p>Hidratos de Carbono: 66,7 g Dos quais Açúcares: 2,15 g</p> | |
| <p>Quantificação de <i>Escherichia coli</i>: $\leq 1 \times 10$ ufc/g</p> | <p>Fibra: 5,70 g</p> | |
| <p>Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>: Negativo em 25 g</p> | <p>Proteínas: 14,30 g Sal: 1,06 g</p> | |
| <p>Nota: Estes parâmetros são analisados periodicamente, conforme procedimento definido no controlo analítico interno da empresa.</p> | | |
| <p>MODO DE CONSERVAÇÃO/EMBALAMENTO</p> | <p>VALIDADE E UTILIZAÇÃO PREVISTA</p> | |
| <p>Conservar em local seco e fresco, ao abrigo da luz solar. Após abertura da embalagem colocar os cubos de pão de microalgas tostados numa caixa bem fechada. Embalado em Película Alimentar:</p> | <p>(Por analisar)</p> | |
| <p>CLIENTE ALVO</p> | <p>CONSUMIDOR ALVO</p> | |
| <p>Distribuição</p> | <p>População em geral, exceto intolerantes a derivados de <i>leite, glúten, soja e sementes de sésamo</i>.</p> | |
| <p>FORMAS DE APRESENTAÇÃO</p> | <p>DESIGNAÇÃO COMERCIAL DO ARTIGO</p> | |
| <p>75 g</p> | <p>Croutons MICROALGA Branca ou Amarela</p> | |
| <p>Rialto – Indústria Alimentar, Lda.</p> | <p>Edição:</p> | <p>1</p> |
| | <p>Data:</p> | <p>12/06/2022</p> |