



# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

**VALORIZAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA BIOMASSA DE *CHLORELLA***

por

Paula Andrea Martínez Aldana

Janeiro, 2026





# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

### **VALORIZAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA BIOMASSA DE *CHLORELLA***

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia e Inovação

por

Paula Andrea Martínez Aldana

Orientadora (Empresa): Mestre Ana Isabel Faustino Barros

Coorientadora (Empresa): Doutora Camilly Fratelli Pereira

Tutora (Universidade): Doutora Ana Maria Gomes

Janeiro, 2026



## Resumo

As microalgas têm ganho crescente relevância devido ao seu elevado valor nutricional e ao potencial para aplicação em produtos alimentares sustentáveis. A *Chlorella* branca (*Chlorella* sp. “white variant”), obtida por cultivo heterotrófico e caracterizada pelo baixo teor de clorofila, apresenta vantagens sensoriais face às microalgas verdes convencionais, tornando-se um ingrediente promissor para formulações de base vegetal.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do estágio curricular realizado na Allmicroalgae – Natural Products S.A., e teve como objetivo avaliar o potencial tecnológico e alimentar da biomassa de *Chlorella* branca. O estudo foi dividido em três partes: (i) análise do efeito da variação do rácio C/N na composição da biomassa, (ii) caracterização das propriedades tecno-funcionais da biomassa húmida e em pó e (iii) incorporação da biomassa numa bebida vegetal.

Na primeira parte verificaram-se alterações no teor de amido e proteína em função do rácio C/N, embora esses efeitos não tenham sido reproduzidos à escala de fermentador. A segunda parte mostrou que a biomassa apresenta propriedades tecnológicas relevantes, nomeadamente solubilidade dependente da temperatura e elevada capacidade emulsificante, com a biomassa seca a revelar maior estabilidade em emulsão. A análise colorimétrica indicou ainda boa estabilidade cromática em condições térmicas moderadas.

Na terceira parte, a formulação de uma bebida vegetal contendo 3% de biomassa em pó demonstrou um perfil nutricional favorável, permitindo alegações nutricionais de: “fonte de fibra”, “fonte de proteína” e “alto teor de vitamina B12”. Contudo, a avaliação sensorial revelou uma diminuição da aceitação global com a adição de *Chlorella* branca, especialmente ao nível do sabor, textura e apreciação global, quando comparada com a bebida base e a referência comercial.

Em conclusão, a *Chlorella* branca apresenta potencial tecnológico para aplicação alimentar, sobretudo como agente funcional e emulsificante natural. No entanto, o impacto sensorial observado realça a necessidade de otimização futura das formulações para melhorar a aceitação do consumidor.

**Palavras-chave:** *Chlorella* branca; Biomassa microalgal; Propriedades tecno-funcionais; Aplicação alimentar.



## **Abstract**

Microalgae have emerged as promising ingredients due to their nutritional density and functional properties, making them attractive for the development of sustainable plant-based foods. White *Chlorella* (*Chlorella* sp. white variant), produced heterotrophically and characterized by its low chlorophyll content, offers improved sensory attributes compared to conventional green microalgae.

This dissertation was developed during an internship at Allmicroalgae – Natural Products S.A., focusing on the technological characterization of White *Chlorella* biomass and its potential application in a plant-based beverage. The work was divided into three parts: evaluation of biomass composition under different C/N ratios, assessment of techno-functional properties of fresh and dried biomass, and incorporation of the biomass into a commercial-style oat drink.

In the first part, changes in protein and starch content were observed in response to C/N variation, although these effects were not reproduced at bioreactor scale. The second part demonstrated that the biomass exhibits relevant techno-functional characteristics, including thermal-dependent solubility and strong emulsifying capacity, with the dried biomass showing high stability in emulsions. Color analysis further indicated good chromatic stability under moderate thermal conditions.

In the final part, a beverage formulated with 3% White *Chlorella* powder presented a favorable nutritional profile, allowing claims such as “source of fiber”, “source of protein” and “high in vitamin B12”. However, sensory evaluation revealed that the microalga reduced the acceptance of the product, particularly in flavor, color, texture, and overall appreciation, when compared to the base beverage and the commercial reference.

In conclusion, White *Chlorella* biomass shows promising technological potential for food applications, particularly as a natural emulsifying and functional ingredient. Nevertheless, its sensory impact in beverages remains a challenge, highlighting the need for further formulation strategies to improve consumer acceptance.

**Keywords:** White *Chlorella*; Microalgal biomass; Techno-functional properties; Food application.



## ÍNDICE

<b>Resumo</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	VII
<b>Lista de figuras</b> .....	IX
<b>Lista de tabelas</b> .....	XI
<b>1. Corpo do relatório de estágio</b> .....	1
1.1. Introdução .....	1
1.2. Apresentação da Allmicroalgae – Natural Products S. A. ....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo geral .....	4
1.3.2. Objetivos específicos .....	4
1.4. Organização do relatório.....	4
1.5. Enquadramento Teórico.....	4
1.5.1. Microalgas como ingredientes alimentares.....	4
1.5.2. Composição nutricional da <i>Chlorella</i> e seu papel na saúde.....	6
1.6. Propriedades Tecno-Funcionais da Biomassa de <i>Chlorella</i> .....	7
1.6.1. Solubilidade.....	7
1.6.2. Emulsificação e formação de espuma .....	7
1.6.3. Capacidade Gelificante.....	8
1.6.4. Propriedades de Reologia .....	8
1.7. Utilização de <i>Chlorella</i> como ingrediente alimentar.....	9
1.8. Descrição das Atividades Realizadas.....	11
<b>2. PARTE I – Cultivo Experimental com Variação do Rácio C/N</b> .....	13
2.1. Introdução .....	13
2.2. Materiais e métodos .....	16
2.2.1. Desenho experimental e condições de cultivo.....	16
2.2.2. Determinação de amido .....	18
2.2.3. Conteúdo de proteínas.....	19
2.2.4. Análise estatística .....	19

2.3.	Resultados e discussão .....	19
<b>3.</b>	<b>PARTE II – Análise das Propriedades Tecno-funcionais da Biomassa de <i>Chlorella</i></b>	<b>23</b>
3.1.	Introdução .....	23
3.2.	Materiais e métodos .....	24
3.2.1.	Preparação das amostras (concentração e tratamento térmico) .....	24
3.2.2.	Solubilidade .....	25
3.2.3.	Emulsão .....	26
3.2.4.	Capacidade gelificante .....	27
3.2.5.	pH .....	27
3.2.6.	Cor .....	27
3.3.	Resultados e discussão .....	29
<b>4.</b>	<b>Parte III – Aplicação Alimentar da Biomassa de <i>Chlorella</i></b>	<b>39</b>
4.1.	Introdução .....	39
4.2.	Materiais e métodos .....	41
4.2.1.	Incorporação da biomassa experimental.....	41
4.2.2.	Análise sensorial .....	42
4.2.3.	Análises reológicas .....	43
4.3.	Resultados e discussão .....	43
<b>5.</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>51</b>
5.1.	Conclusões .....	51
5.2.	Perspetivas Futuras .....	52
<b>6.</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Apêndices.....</b>	<b>59</b>
7.1.	Apêndice I.....	59
7.2.	Apêndice II.....	60
7.3.	Apêndice III.....	62

## Lista de abreviaturas

BC1	Bebida vegetal comercial
B0	Bebida vegetal sem <i>Chlorella</i>
BCW1	Bebida com <i>Chlorella</i> atual
BCW2	Bebida com <i>Chlorella</i> modificada
C/N	Rácio carbono/azoto
CIE	<i>Commission Internationale de l'Éclairage</i>
CIELAB	Espaço de cor definido pela <i>Commission Internationale de l'Éclairage</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DO <sub>600</sub>	Densidade ótica a 600 nanometros
EC	Capacidade de emulsão
ES	Estabilidade da emulsão
I&D	Investigação e Desenvolvimento
ISA	índice de solubilidade em água
OGM	Organismo geneticamente modificado
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados (Polyunsaturated Fatty Acids)
v/v	Volume por volume
WC	<i>Chlorella</i> branca
WCP	<i>Chlorella</i> branca em pó
WCF	<i>Chlorella</i> branca húmida
WCPA	Biomassa padrão <i>Chlorella</i> branca em pó
WCPM	Biomassa modificada <i>Chlorella</i> branca em pó
WCPM-amb	Biomassa modificada <i>Chlorella</i> branca em pó temperatura ambiente
WCPM-85	Biomassa modificada <i>Chlorella</i> branca em pó temperatura 85 °C
C <sub>glu</sub>	Concentração de glicose (mg·mL <sup>-1</sup> )
m/V	Relação massa/volume
m <sub>amostra</sub>	Massa da biomassa seca utilizada (mg)
m <sub>t</sub>	Massa total de biomassa utilizada (g)
m <sub>SS</sub>	Peso seco do sobrenadante (g)
m <sub>pf</sub>	Peso do prato com o sobrenadante seco (g)
m <sub>pv</sub>	Peso do prato vazio (g)
V <sub>final</sub>	Volume final do extrato (mL)
V <sub>total</sub>	Volume total da emulsão (mL)

$V_{\text{fase aquosa}}(t)$	Volume da fase aquosa (mL) no tempo $t$
$V_{\text{fase aquosa}}(t = 0)$	Volume da fase aquosa (mL) no tempo $t=0$
$L^*$	Luminosidade
$a^*$	Coordenada cromática no eixo verde-vermelho
$b^*$	Coordenada cromática no eixo azul-amarelo
$C^*$	Croma (intensidade ou saturação da cor)
$h^\circ$	Ângulo de matiz
$\Delta E_{00}$	Diferença total de cor
$\Delta L'$	Diferença corrigida de luminosidade
$\Delta C'$	Diferença corrigida de croma
$\Delta H'$	Diferença corrigida de matiz
$S_L$	Fator de ponderação da luminosidade
$S_C$	Fator de ponderação do croma
$S_H$	Fator de ponderação do matiz
$R_T$	Termo de rotação (interação entre matiz e croma)

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Etapa de inoculação do cultivo de <i>Chlorella</i> . (A) Inoculação sob condições controladas de temperatura, agitação e escuridão. (B) Microscopia ótica das células de <i>Chlorella</i> durante a fase de inoculação (barra = 20 $\mu$ m). .....	17
<b>Figura 2.</b> Crescimento celular, consumo de substratos e composição da biomassa de <i>Chlorella</i> antes e após a fase de indução sob diferentes relações C/N. (A) Variação da densidade ótica (D.O. 600 nm), da concentração de glicose e da amônia ao longo da fase de indução. (B) Conteúdo percentual de proteína e amido na biomassa colhida após a indução. Os valores representam médias $\pm$ desvio-padrão (n = 3); letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias (teste de Tukey, p < 0,05). .....	21
<b>Figura 3.</b> Preparação das amostras <i>Chlorella</i> branca em pó (A) e húmida (B) preparadas em diferentes concentrações (2, 5 e 10 % m/v) e submetidas a distintos tratamentos térmicos (Ambiente, 85 °C e 121 °C). .....	25
<b>Figura 4.</b> Variação do pH da biomassa WC em função do tipo de biomassa e da temperatura após a aplicação do tratamento térmico. ....	29
<b>Figura 5.</b> Índice de solubilidade da biomassa WC em função do tipo de biomassa e da temperatura. Os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey, p < 0,05). ....	29
<b>Figura 6.</b> Estabilidade da emulsão da biomassa WC em função do tipo de biomassa e da temperatura. (A) Estabilidade da emulsão após 60 min; os valores correspondem à média $\pm$ desvio-padrão (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey, p < 0,05). (B) Evolução temporal da estabilidade da emulsão ao longo de 60 min; os dados representam apenas a tendência descritiva das médias observadas, sem análise estatística. ....	30
<b>Figura 7.</b> Variação do croma (C*) da biomassa em pó de <i>Chlorella</i> branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias), sob diferentes temperaturas (ambiente, 85 °C e 121 °C). .....	32
<b>Figura 8.</b> Variação do matiz (h°) da biomassa em pó de <i>Chlorella</i> branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias), sob diferentes temperaturas (ambiente, 85 °C e 121 °C). .....	32
<b>Figura 9.</b> Diferença total de cor ( $\Delta E_{00}$ ) da biomassa em pó de <i>Chlorella</i> branca (WCP) entre o dia 0 e o dia 3, sob diferentes temperaturas (ambiente, 85 °C e 121 °C). .....	33
<b>Figura 10.</b> Capacidade de gelificação das biomassas WCPA (A) e WCPM (B) em diferentes concentrações (3–20%, m/v). .....	34

<b>Figura 11.</b> Estabilidade da emulsão (ES%) das biomassas WCPA e WCPM em função do tempo a 25 °C e 85 °C. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre as biomassas (teste de Tukey HSD, $\alpha = 0,05$ ) dentro de cada tempo e temperatura. As barras de erro representam o desvio padrão (n = 3). .....	35
<b>Figura 12.</b> Efeito da biomassa (WCPA, WCPM) e da temperatura (ambiente e 85 °C) sobre o índice de solubilidade em água (ISA $\pm$ SE). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). .....	37
<b>Figura 13.</b> Biomassa Chlorella sp. (WC) utilizada na formulação da bebida. ....	41
<b>Figura 14.</b> Comparação do perfil de aceitação sensorial das amostras 319, 475, 682 e 740 nos atributos cor, aroma, sabor, textura e apreciação global.....	47
<b>Figura 15.</b> Curvas reológicas das bebidas vegetais base, comerciais e com Chlorella branca. (A) “Shear stress” (Pa) vs “shear rate” (1/s). (B) “Instantaneous viscosity” (Pa.s) vs “shear rate” (1/s).....	48
<b>Figura 16.</b> Composição nutricional (A), embalagem do produto (B) e alegações nutricionais (C) da bebida vegetal à base de aveia, tâmaras, avelãs, pistáchios e 3 % de Chlorella branca (WCP).....	50

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Condições experimentais do cultivo heterotrófico de <i>Chlorella</i> com variação do rácio C/N. ....	17
<b>Tabela 2.</b> Correspondência entre os códigos e as amostras testadas. ....	42
<b>Tabela 3.</b> Composição de bebidas vegetais disponíveis no mercado (2024–2025).....	44
<b>Tabela 4.</b> Médias ( $\pm$ desvio padrão) dos atributos sensoriais das amostras de produto, com letras de significância (a, b, ab) indicando diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ). ....	49
<b>Tabela 5.</b> Valores C* da biomassa em pó de <i>Chlorella</i> branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias), sob diferentes temperaturas (Ambiente, 85 °C e 121 °C) e concentrações (2 %, 5 % e 10 %).....	59
<b>Tabela 6.</b> Valores do ângulo de matiz (h°) da biomassa em pó de <i>Chlorella</i> branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias) sob diferentes temperaturas (Ambiente, 85 °C e 121 °C) e concentrações (2 %, 5 % e 10 %). ....	59

## 1. Corpo do relatório de estágio

### 1.1. Introdução

O crescente interesse por ingredientes de origem vegetal com benefícios nutricionais e funcionais tem impulsionado a investigação e o desenvolvimento de novos produtos alimentares mais sustentáveis e saudáveis. Neste contexto, as microalgas destacam-se como fontes promissoras de proteínas, vitaminas, minerais e compostos bioativos, além de apresentarem propriedades tecno-funcionais atrativas, como capacidade emulsionante, gelificante, de retenção de água e formação de espuma (Espinosa-Ramírez et al., 2023; García-Encinas et al., 2025; Prates, 2025).

As proteínas das microalgas combinam benefícios nutricionais, funcionais e ambientais, posicionando-se como alternativa sólida às proteínas convencionais. Apresentam perfis completos de aminoácidos, são ricas em compostos bioativos como antioxidantes e ácidos gordos polinsaturados. Funcionalmente, exibem propriedades de solubilidade, emulsificação e gelificação, que permitem a sua aplicação em diversos sistemas alimentares, como bebidas vegetais, produtos de panificação e formulações inovadoras, incluindo alimentos impressos em 3D (Prates, 2025).

Entre as microalgas de maior interesse para a alimentação, a *Chlorella* destaca-se pelas suas aplicações na nutrição humana e pelo perfil nutricional; proteína (34–49 %), fibra (12–28 %), lípidos (8–11 %) e hidratos de carbono (13–24 %), além de conter vitaminas do complexo B, minerais e ácidos gordos polinsaturados (Allmicroalgae, 2025). No entanto, o conhecimento sobre as suas propriedades tecno-funcionais continua limitado, sobretudo quanto à influência de fatores de cultivo (como o rácio C/N), da concentração da biomassa e dos tratamentos térmicos sobre o desempenho funcional (Prates, 2025).

Do ponto de vista sensorial, características como pigmentação verde intensa e sabores vegetais fortes restringem a aceitação do consumidor, justificando a investigação em despigmentação, mascaramento de sabor e modificação proteica para melhorar a palatabilidade sem comprometer o valor nutricional (Prates, 2025). Adicionalmente, as microalgas produzem biomoléculas de elevado valor, como proteínas, polissacarídeos, glicolípídios e fosfolípídios, que atuam como tensioativos naturais e contribuem para a estabilização de emulsões e espumas (Georgiou et al., 2024). Em particular, a *Chlorella sorokiniana* tem demonstrado boa capacidade emulsionante e gelificante: as suas proteínas solúveis obtidas por disrupção celular,

centrifugação e liofilização apresentam alta estabilidade de emulsão em  $\text{pH} \geq 5$  e formam géis estáveis a  $61\text{ }^\circ\text{C}$ , embora a capacidade de formação de espuma ainda não tenha sido completamente avaliada (Georgiou et al., 2024).

A literatura reforça que diferentes espécies de *Chlorella* podem desempenhar um papel estruturante em alimentos, funcionando como agentes de textura em formulações com propriedades emulsionantes ou gelificantes. Contudo, os dados experimentais ainda são escassos, sendo necessários estudos aplicados em condições controladas, avaliando estabilidade de emulsão, solubilidade, pH, cor e capacidade de formação de gel como base para a sua incorporação em sistemas alimentares (Georgiou et al., 2024; Polewski et al., 2025; Prates, 2025).

Durante o estágio curricular do 2.º ano do Mestrado em Biotecnologia e Inovação, desenvolvido na empresa Allmicroalgae – Natural Products S. A., foi possível integrar um projeto centrado na caracterização funcional da *Chlorella* branca (WC). A *Chlorella sp.* Branca, desenvolvida pela Allmicroalgae com o nome comercial White *Chlorella* Allma<sup>®</sup>, constitui uma variante inovadora obtida por mutagénese aleatória seguida de pressão seletiva, um processo que permitiu isolar estirpes com conteúdo de clorofila significativamente reduzido. O cultivo heterotrófico desta estirpe, devido à ausência de luz, permite também evitar a expressão de clorofila, pelo que atenua o sabor e a coloração verde característicos da biomassa convencional, conferindo-lhe propriedades sensoriais e visuais mais favoráveis para aplicação alimentar (Schüler et al., 2020; Trovão et al., 2022, 2024)

A biomassa mantém valor nutricional elevado, com 35–40 % de proteína, mais de 20 % de fibra alimentar, além de ácidos gordos polinsaturado (ómega-3, -6 e -9), vitaminas B2 e B12, zinco e fósforo, apresentando um perfil livre de OGM, glúten e lactose. Estas características tornam a WC um ingrediente funcional de origem microalgal versátil e seguro, com potencial para substituir bases lácteas e atuar como agente texturizante e espessante em formulações alimentares de base vegetal (Allmicroalgae, 2025).

O estágio incidiu, assim, na avaliação funcional da biomassa atual de WC e na exploração de estratégias de cultivo e tratamentos térmicos capazes de melhorar o desempenho tecnológico da biomassa, visando a aplicação alimentar. Desta forma, o trabalho procurou responder a uma necessidade concreta da empresa e, simultaneamente, contribuir para o avanço científico sobre a utilização desta biomassa como ingrediente funcional microalgal, avaliando o seu potencial de aplicação e valorização no desenvolvimento de produtos de base vegetal.

## 1.2. Apresentação da Allmicroalgae – Natural Products S. A.

A Allmicroalgae – Natural Products S.A. é uma empresa biotecnológica portuguesa, reconhecida como uma das principais produtoras europeias de biomassa de microalgas. Com sede em Pataias, Portugal, dedica-se à produção e desenvolvimento de soluções naturais à base de microalgas para os setores alimentar, nutracêutico, agrícola e cosmético. A empresa distingue-se pelo investimento contínuo em inovação, qualidade alimentar e sustentabilidade, recorrendo a diferentes modos de cultivo (autotrófico e heterotrófico) em diferentes sistemas industriais (Allmicroalgae, 2021). O compromisso com a sustentabilidade ambiental, social e económica está refletido na sua missão de disponibilizar soluções naturais e funcionais de microalgas com elevado padrão de qualidade. A Allmicroalgae está certificada por diversas entidades nacionais e internacionais, incluindo a produção biológica europeia, ISO 22000, PT-BIO-03 e certificação Halal, o que reforça o seu posicionamento como referência na área das microalgas.

O estágio curricular foi desenvolvido no Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D), cuja atuação centra-se na otimização das condições de produção de microalgas e na melhoria das suas propriedades bioquímicas e funcionais, para atender às exigências dos seus parceiros comerciais e científicos. O trabalho decorreu, em particular, na área de fermentação heterotrófica, onde se realizam ensaios em pequena escala com diferentes condições de cultivo, focados na produção de biomassa com características específicas para aplicação alimentar.

O departamento dispõe de laboratórios preparados para experimentação com sistemas autotróficos e heterotróficos, incluindo câmaras de cultura, reatores laboratoriais, equipamentos analíticos e instalações piloto que permitem a transição dos resultados de escala laboratorial para condições mais próximas da realidade industrial (Allmicroalgae, n.d.).

Além das atividades realizadas nas instalações da Allmicroalgae, algumas experiências foram conduzidas no GREENCOLAB - Associação Oceano Verde - Laboratório Colaborativo para o Desenvolvimento de Tecnologias e Produtos Verdes do Oceano (Food Nutrition and Biorefinery Working Groups) e na Universidade Católica Portuguesa (UCP), no âmbito do mestrado em Biotecnologia e Inovação, com o apoio da equipa científica das instituições.

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo geral

Avaliar as propriedades tecno-funcionais da biomassa de *Chlorella* branca produzida pela empresa Allmicroalgae - Natural Products S. A. sob diferentes condições, e explorar a aplicação da biomassa otimizada como ingrediente funcional numa bebida vegetal.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar os parâmetros de produção relevantes para as características funcionais da biomassa de *Chlorella*.
- Caracterizar as propriedades funcionais da biomassa “standard” em diferentes concentrações e tratamentos térmicos.
- Avaliar o efeito da razão C/N na acumulação de amido e produção de proteína.
- Comparar a biomassa “standard” e a biomassa obtida em condições modificadas de cultivo.
- Aplicar a biomassa numa matriz alimentar, bebida vegetal, e análise do seu impacto como ingrediente funcional.

### 1.4. Organização do relatório

O Capítulo 1 apresenta o enquadramento do relatório de estágio, os objetivos do trabalho e a caracterização da empresa de acolhimento. O Capítulo 2 corresponde ao enquadramento teórico, abordando as microalgas como ingredientes alimentares, as propriedades nutricionais e tecno-funcionais da *Chlorella* e nas suas aplicações no setor alimentar. O Capítulo 3 descreve as atividades realizadas durante o estágio e as competências desenvolvidas. Os Capítulos 4 e 5 reúnem a metodologia e os resultados da fase de cultivo experimental, enquanto os Capítulos 6 e 7 apresentam a metodologia e os resultados da fase de aplicação alimentar da biomassa numa bebida vegetal. Por fim, o Capítulo 8 inclui as conclusões, as limitações do estudo e as perspetivas para trabalhos futuros, seguidas dos apêndices, anexos e referências bibliográficas.

### 1.5. Enquadramento Teórico

#### 1.5.1. Microalgas como ingredientes alimentares

As microalgas constituem um grupo muito diverso de microrganismos fotossintéticos, com cerca de 40.000 espécies descritas. Incluem sobretudo microalgas eucariotas verdes, como as do género *Chlorella*, bem como outras espécies amplamente exploradas, como *Porphyra*, *Nannochloropsis*, *Dunaliella* e membros da família *Haematococcaceae* (Hernández et al.,

2022; Safi et al., 2014). Embora frequentemente tratada como microalga, a *Limnospira* (também designada *Arthrospira* ou *Spirulina*) é, na verdade, uma cianobactéria, sendo necessária essa distinção, apesar de ser reconhecida comercialmente no mesmo contexto (Pinchart et al., 2024).

Neste contexto, a procura por proteínas alternativas às de origem animal tem impulsionado o desenvolvimento de ingredientes sustentáveis que possam ser comparados às fontes vegetais convencionais. Tradicionalmente, a soja, as leguminosas e as sementes oleaginosas constituíram as principais opções na categoria de proteínas de origem vegetal. No entanto, surgem atualmente proteínas derivadas de microalgas como uma alternativa não animal particularmente relevante (Espinosa-Ramírez et al., 2023; Guo et al., 2024). Embora não pertençam taxonomicamente ao reino vegetal, as microalgas são consideradas uma fonte proteica “plant-based” pela indústria alimentar, devido ao seu carácter não animal, elevado valor nutricional e perfil de aminoácidos comparável ou até superior ao de muitas proteínas vegetais (Espinosa-Ramírez et al., 2023).

A *Chlorella sp.* tem um grande potencial na indústria alimentar, devido às suas características nutricionais e à sua flexibilidade na produção. Embora seja cultivada principalmente em condições autotróficas, pode também ser adaptada a condições heterotróficas ou mixotróficas. Por exemplo, a *C. vulgaris* cultivada sob condições autotróficas apresenta tipicamente a seguinte composição nutricional: 51-58% de proteína, 12-17% de polissacarídeos e 14-22% de lípidos. Além dos macronutrientes, contém compostos bioativos, todos os aminoácidos essenciais, ácidos gordos polinsaturados (PUFA), polissacarídeos, clorofilas, carotenoides, vitaminas e minerais (Falcão et al., 2023).

As microalgas são consideradas uma das fontes promissoras de ingredientes alimentares funcionais, motivo pelo qual diversos estudos têm demonstrado a fortificação de vários produtos alimentares com microalgas, como massas, pão e bolachas, entre outros, evidenciando o grande potencial destes microrganismos como aditivo alimentar, mesmo em níveis baixos (Hernández et al., 2022).

Por isso para aumentar o seu apelo, tem havido um foco crescente na extração de proteínas da biomassa e na aplicação das suas propriedades tecno-funcionais em produtos alimentares já existentes. A capacidade de formação de espuma, emulsão e gelificação são algumas das propriedades desejáveis, sendo responsáveis por conferir textura, consistência e retenção de sabor aos produtos alimentares (Nunes et al., 2024).

### 1.5.2. Composição nutricional da *Chlorella* e seu papel na saúde

As proteínas são metabolitos primários das microalgas, e a biomassa seca destas pode ter uma alta proporção de proteínas, superando até mesmo os alimentos vegetais e animais tradicionais. Em espécies como *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Scenedesmus obliquus*, as proteínas podem representar mais de 50% da matéria seca, muito mais do que as leguminosas (20-40%) ou o queijo (~25%). Este alto teor de proteínas confere às microalgas uma vantagem natural na produção de proteínas, permitindo que sejam utilizadas diretamente como farinha de proteína crua em suplementos dietéticos (Yang et al., 2024).

O valor nutricional e a qualidade da proteína de microalgas são considerações importantes para o seu uso como ingrediente alimentar. A composição de aminoácidos e o conteúdo de aminoácidos essenciais na proteína de microalgas são indicadores-chave do seu valor dietético. Geralmente, as proteínas vegetais são deficientes em um ou mais aminoácidos essenciais, como metionina e cisteína ou triptofano em leguminosas (por exemplo, feijão, ervilhas, lentilhas) (Yang et al., 2024). Conforme a literatura, o *score* de aminoácidos e o índice de aminoácidos essenciais para algumas microalgas, como *L. platensis*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Microchloropsis gaditana* e *Tetraselmis chui*, são comparáveis à caseína do leite ou ao ovo, e superiores à farinha de soja ou à proteína de trigo (Yang et al., 2024). Embora tenha sido reportado que algumas microalgas, como *Chlorella* e *Tetrademus obliquus*, possam ter deficiência de histidina ou isoleucina, geralmente considera-se que as proteínas de microalgas apresentam um perfil relativamente equilibrado de aminoácidos (Thakur et al., 2024; Yang et al., 2024).

Em algumas microalgas (por exemplo do género *Chlorella*), os carboidratos, os lípidos e as proteínas podem ser produzidos e acumulados em diferentes condições de crescimento, e a proporção destes na microalga pode ser usada como indicador do estado fisiológico da célula. A relação entre os nutrientes das microalgas pode ser modulada através da engenharia genética e métodos de cultivo para otimizar a produção dos produtos desejados (Yang et al., 2024). Em estudos recentes, *Chlorella sorokiniana* foi cultivada por meio de um cultivo heterotrófico de alta densidade, atingindo concentrações de biomassa superiores a 230 g/L em fermentadores de escala laboratorial e piloto (Thakur et al., 2024).

No entanto, o cultivo heterotrófico apresenta desafios técnicos e custos elevados, nomeadamente considerando a fonte de carbono orgânico e os nutrientes necessários para o meio de cultura. Em contrapartida, o cultivo autotrófico, embora tipicamente mais económico em termos de consumo energético e considerando a fonte de carbono, resulta numa baixa

densidade de microalgas e elevados volumes para processamento e, por estar dependente da sazonalidade/condições ambientais, dificulta o controle da qualidade das proteínas. Por sua vez, o cultivo mixotrófico, que combina as vantagens dos métodos autotróficos e heterotróficos, surge como uma opção eficaz, pois reduz os custos e favorece a acumulação de proteínas. No entanto, o rendimento final de proteínas pode variar dependendo de vários fatores, como as características biológicas das microalgas, a estirpe utilizada e as condições de cultivo (Yang et al., 2024).

## 1.6. Propriedades Tecno-Funcionais da Biomassa de *Chlorella*

### 1.6.1. Solubilidade

A solubilidade das proteínas é um fator chave que influencia os aspectos físicos, químicos, sensoriais e nutricionais dos produtos alimentares que contêm ingredientes ricos em proteínas. Esta propriedade afeta a forma como os materiais alimentares são processados, armazenados e consumidos. Neste contexto, foi verificado que *Chlorella pyrenoidosa* e *Nannochloropsis oceanica* apresentam a solubilidade mais baixa perto do seu ponto isoelétrico de pH 5, o que é consistente com estudos anteriores sobre outras proteínas alimentares, como a farinha de soja, as caseínas, as proteínas de feijão mungo e algumas proteínas de microalgas (*Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis*) (Thakur et al., 2024).

O comportamento da solubilidade de uma proteína afeta diretamente as suas propriedades funcionais, pelo que os extratos de proteínas de microalgas podem apresentar propriedades tecno-funcionais únicas, especialmente quando comparados com as proteínas de origem vegetal. Um exemplo de microalga que se destaca pelas suas propriedades tecno-funcionais é a *Chlorella vulgaris*, uma alga verde (Chlorophyta) que contém proteínas de elevado peso molecular. Os extratos de proteína de *Chlorella vulgaris* também mostram uma excelente capacidade emulsionante, comparável ou até superior às proteínas comerciais, como o caseinato de sódio e as proteínas de soja (Thakur et al., 2024).

### 1.6.2. Emulsificação e formação de espuma

Na indústria alimentar, as emulsões e espumas são fundamentais em diversos produtos, como molhos, cremes e sobremesas. Estes sistemas, compostos por dois líquidos imiscíveis, como água e óleo para emulsões, e água e ar para espumas, dependem das propriedades interfaciais das proteínas para a sua estabilidade. Tradicionalmente, utilizam-se surfactantes sintéticos ou proteínas animais (como as de leite e ovos) para estabilizar essas interfaces (Safi et al., 2014; Thakur et al., 2024). No entanto, as proteínas de *Chlorella vulgaris* têm se destacado

devido à sua excelente capacidade emulsionante e espumante, sendo comparáveis ou até superiores a ingredientes comerciais como o caseinato de sódio (Thakur et al., 2024). As frações proteicas de *Chlorella protothecoides* demonstraram atividades interfaciais mais elevadas em emulsões de óleo em água, e as gotas da emulsão mantêm-se estáveis face à coalescência a concentrações de proteína de 3% ou mais (Safi et al., 2014). A *Chlorella vulgaris* demonstrou maior capacidade emulsionante a pH 7, o que é ideal para várias aplicações alimentares. Além disso, as suas boas propriedades espumantes estão correlacionadas com a sua solubilidade, o que também favorece o seu uso na indústria para estabilizar produtos como espumas e emulsões. Essas propriedades funcionais tornam as proteínas da *Chlorella* sp. uma alternativa promissora às proteínas de origem animal na formulação de alimentos, tendo potencial para se tornar um ingrediente valioso na indústria alimentar, desde que sejam otimizados os processos de extração e purificação para a redução de custos e aumento da eficiência produtiva (Thakur et al., 2024).

#### 1.6.3. Capacidade Gelificante

A gelificação é um processo que envolve múltiplas etapas, começando com a agregação de moléculas que formam uma vasta matriz tridimensional. Esta matriz aprisiona várias moléculas de solvente, resultando numa substância com características viscoelásticas distintas. O processo de agregação e a posterior gelificação podem ser desencadeados por várias alterações nas condições circundantes do biopolímero, como alterações de temperatura, pH ou a aplicação de enzimas ou de pressão (Safi et al., 2014; Thakur et al., 2024). Durante este processo, a estrutura do biopolímero sofre uma desnaturação parcial, o que facilita uma variedade de interações, sejam específicas ou inespecíficas (Thakur et al., 2024). Neste sentido, algumas microalgas, como a *Chlorella*, também demonstram capacidade de gelificação dos seus biopolímeros. Por exemplo, no artigo de Safi et al. (2014), é mencionado que os extratos de proteínas de *Chlorella sorokiniana* foram utilizados para produzir géis induzidos por calor, obtendo redes de gel estáveis com uma concentração de 9,9 g/100 mL e uma temperatura de 61 °C (Safi et al., 2014; Thakur et al., 2024).

#### 1.6.4. Propriedades de Reologia

A viscosidade é a medida da resistência de uma proteína ao fluxo, sendo uma propriedade reológica essencial em diversos processos, incluindo os alimentares. Esta característica reológica é quantificada pela relação entre o esforço cortante aplicado e a velocidade de corte resultante, sendo observada tanto em fluidos newtonianos como não newtonianos. A viscosidade de uma solução de biopolímero, como as proteínas de microalgas, é influenciada por vários fatores, como a concentração do biopolímero, as interações entre o

biopolímero e o solvente, e os atributos estruturais do biopolímero, incluindo o seu tamanho, forma e flexibilidade molecular (Thakur et al., 2024).

As proteínas de microalgas demonstraram propriedades de viscosidade e capacidade de formar géis que podem ser vantajosas em várias aplicações alimentares, substituindo ou complementando agentes espessantes tradicionais. A interação das microalgas com solventes e sua estrutura molecular flexível são fatores que contribuem para essas propriedades, tornando-as uma alternativa promissora na indústria alimentária (Thakur et al., 2024).

### 1.7. Utilização de *Chlorella* como ingrediente alimentar

A forma mais comum de utilizar proteína de microalgas em alimentos é através da adição direta da biomassa integral, uma vez que esta abordagem dispensa processos de extração e preserva a matriz nutricional original. Embora os extratos proteicos de microalgas possam oferecer maior funcionalidade tecnológica e aplicações mais específicas, importa referir que, na maioria dos casos, estes são classificados como Novel Food ao abrigo do Regulamento (UE) 2015/2283 e, por isso, requerem autorização prévia da União Europeia antes de serem comercializados (Cruz & Vasconcelos, 2023; Mendes et al., 2022). Esta exigência regulatória constitui uma das principais razões pelas quais a utilização de biomassa integral surge como uma alternativa vantajosa, permitindo a incorporação de microalgas em alimentos de forma mais simples e com menores barreiras regulamentares. Graças à sua elevada qualidade nutricional esta proteína é ideal para alimentos comuns; já que a sua atividade biológica, nomeadamente atividades antioxidante, antimicrobiana e antihipertensiva, é vantajosa para a criação de produtos alimentares de alto valor acrescentado (Yang et al., 2024).

As ricas e diversificadas propriedades tecno-funcionais da proteína de microalgas permitem a sua utilização de várias formas na preparação de alimentos (Thakur et al., 2024). A proteína de microalgas, como a de *Chlorella vulgaris*, pode ser utilizada em diversas aplicações alimentares, como sopas, molhos, cremes e produtos untáveis, devido à sua alta estabilidade e capacidade emulsionante (Hernández et al., 2022; Yang et al., 2024). Estas características tornam-nas uma alternativa promissora às proteínas de origem animal, particularmente na formulação de análogos de carne (Yang et al., 2024).

No entanto, são necessárias mais pesquisas sobre a sua viabilidade nestes produtos, pois a biomassa de microalgas pode alterar o sabor, a cor e a textura dos alimentos. Além disso, a proteína de microalgas melhora o perfil de aminoácidos quando adicionada a alimentos

tradicionais. O seu elevado valor nutricional, atividade biológica e capacidade de processamento tornam-na um novo ingrediente para a melhoria das propriedades organolépticas dos produtos alimentares, podendo ser utilizada também como aditivo alimentar, corante natural, agente estruturante ou conservante (Hernández et al., 2022; Yang et al., 2024).

Os produtos lácteos são considerados alimentos com propriedades nutricionais atrativas, além de serem amplamente consumidos a nível mundial. Estes produtos têm inúmeros benefícios para a saúde, por exemplo, a nível intestinal e muscular. Por essa razão, diversos estudos têm-se centrado em explorar novas formas de incorporar matrizes ricas em compostos nutracêuticos para potenciar as propriedades benéficas destes produtos. Um exemplo é a adição de biomassa de microalgas a estes produtos e seus derivados, de forma a torná-los mais nutritivos (Hernández et al., 2022).

Nos estudos apresentados por Hernández et al. (2022), foram identificadas duas formas de adicionar biomassa de microalgas ao iogurte: a adição ao leite antes do processo de fermentação (i) ou a adição ao produto após o processo de fermentação (ii). A escolha de cada abordagem pode influenciar as características físico-químicas, sensoriais e mecânicas do produto. Além disso, o artigo mostra que a incorporação de *Chlorella vulgaris* e *Limnospira platensis* no processo de fermentação de iogurtes tem efeitos diferentes (Hernández et al., 2022).

De acordo com os estudos citados, a fortificação com *L. platensis* nas concentrações de 0,25%, 0,50% e 1,0% mostraram uma maior capacidade tampão em comparação com os tratamentos enriquecidos com *C. vulgaris* nas mesmas concentrações. No entanto, a maior quantidade de nutrientes fornecidos por *C. vulgaris* compensou a sua menor capacidade tampão, resultando em diferenças não significativas na viabilidade dos probióticos nas amostras com ambas as microalgas (Hernández et al., 2022).

Relativamente à incorporação de biomassa de microalgas e os seus derivados em produtos lácteos, a União Europeia (UE), por meio do regulamento EFSA 258/97, estabeleceu que as microalgas utilizadas como ingredientes alimentares antes de 15 de maio de 1997 não são classificadas como “alimento novo” ou “ingrediente novo”, o que permite a sua adição em concentrações ilimitadas a todos os produtos (Hernández et al., 2022).

Por esse motivo, a incorporação de biomassa de microalgas ou derivados de *Limnospira platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella luteoviridis* e *Chlorella pyrenoidosa* tem sido amplamente estudada. Além disso, os alimentos fortificados com microalgas podem apresentar declarações nutricionais, como “alto teor de proteínas” ou “fonte de proteínas”, de acordo com o regulamento (CE) 1924/2006, uma vez que estes ingredientes são reconhecidos pelo seu elevado conteúdo proteico (Hernández et al., 2022).

#### 1.8. Descrição das Atividades Realizadas

O estágio curricular foi desenvolvido na empresa Allmicroalgae – Natural Products, S.A., no Departamento de Investigação e Desenvolvimento (I&D), durante o segundo ano do Mestrado em Biotecnologia e Inovação da Universidade Católica Portuguesa. As atividades decorreram entre 7/10/24 – 31/07/25 sob a supervisão da equipa técnica da empresa e com o acompanhamento científico da universidade.

Durante o primeiro mês, procedeu-se à integração na equipa de fermentação e à formação prática em procedimentos laboratoriais e operacionais relacionados com o cultivo de microalgas. Nesta etapa, foram aprendidas e aplicadas técnicas de preparação de cultivos, colheita e análise de amostras, bem como o trabalho em condições estéreis. Adicionalmente, foram realizados ensaios analíticos de rotina e adquiridos os fundamentos experimentais necessários para a execução dos testes específicos aplicados à biomassa de *Chlorella*.

Em paralelo, iniciou-se a fase de revisão bibliográfica e planeamento experimental, que teve como objetivo estabelecer o enquadramento científico do trabalho e definir as metodologias a aplicar. A pesquisa incidiu sobre as propriedades tecno-funcionais da *Chlorella* e sobre a influência de parâmetros de cultivo, nomeadamente o rácio carbono/azoto (C/N) e os tratamentos térmicos, na composição e funcionalidade da biomassa. Com base na revisão realizada, foram delineadas as duas fases principais do estágio: a fase de cultivo experimental e a fase de aplicação alimentar.

A primeira fase experimental consistiu na execução de ensaios de cultivo heterotrófico de WC com variação controlada do rácio C/N, com o objetivo de avaliar a influência desta variável na composição bioquímica e nas propriedades tecno-funcionais da biomassa. As atividades incluíram o planeamento e realização dos cultivos, o processamento da biomassa obtida e a condução de análises laboratoriais para determinação do teor de amido e proteína, bem como das propriedades de solubilidade, emulsificação e gelificação. Os dados foram tratados e

interpretados de forma a relacionar as condições de cultivo com o comportamento funcional da biomassa.

A fase seguinte centrou-se na aplicação alimentar da biomassa otimizada, através da sua incorporação numa matriz alimentar líquida. Esta etapa envolveu a caracterização físico-química da biomassa em pó e húmida, a preparação das formulações experimentais e a realização de ensaios colorimétricos, reológicos e sensoriais para avaliação do desempenho funcional da biomassa na matriz.

Complementarmente, foi possível participar nas atividades laboratoriais e científicas do Departamento de I&D, assistindo a apresentações e discussões técnicas com outros estagiários e membros da equipa. As atividades contaram com o apoio contínuo dos orientadores e técnicos especializados, que contribuíram para a execução dos ensaios e para o esclarecimento de aspetos técnicos relacionados com o cultivo de microalgas.

O estágio incluiu ainda a colaboração com o GreenCoLab, onde foram aprofundados os conhecimentos sobre as propriedades tecno-funcionais das microalgas e a sua aplicação em matrizes alimentares, e com a Universidade Católica Portuguesa, onde foram realizadas as medições reológicas da bebida formulada e outras análises complementares. Na fase final, procedeu-se à avaliação sensorial do produto obtido, com o intuito de determinar a aceitação global da formulação.

O conjunto das atividades permitiu compreender de forma integrada as etapas de cultivo, caracterização e aplicação alimentar da biomassa de *Chlorella*, reforçando o conhecimento sobre o seu potencial enquanto ingrediente funcional de origem sustentável. Embora algumas atividades tenham decorrido em momentos distintos ou de forma paralela, a sua descrição foi organizada neste capítulo segundo uma sequência lógica que reflete a estrutura metodológica do trabalho.

## 2. PARTE I – Cultivo Experimental com Variação do Rácio C/N

### 2.1. Introdução

No cultivo de microalgas, existem diferentes estratégias e sistemas de produção, que podem ser classificados como abertos ou fechados, cada um apresentando vantagens e limitações específicas. Os sistemas abertos surgiram como uma alternativa mais econômica aos sistemas fechados, principalmente devido à sua menor exigência energética. No entanto, são mais suscetíveis a contaminação, uma vez que as microalgas competem com outros microrganismos presentes no meio, o que pode levar ao colapso do cultivo caso a estirpe não seja suficientemente robusta (Trovão et al., 2022).

Por outro lado, os sistemas fechados oferecem um ambiente mais controlado, que permite regular as condições ambientais e nutricionais, reduzir a contaminação e aumentar a eficiência do processo. Na heterotrofia, as microalgas utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, enquanto em mixotrofia conseguem assimilar CO<sub>2</sub> e carbono orgânico, ativando tanto a fotossíntese como a respiração celular. Este metabolismo flexível permite-lhes alternar entre condições fototróficas e heterotróficas, de acordo com a disponibilidade de luz e nutrientes (Perez-Garcia et al., 2011), porém é restrito apenas a algumas espécies.

As microalgas, para além de constituírem uma fonte sustentável de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas e pigmentos antioxidantes, são consideradas matérias-primas de elevado interesse para as indústrias alimentar e nutracêutica, devido ao seu elevado valor nutricional e ao baixo impacto ambiental que apresentam (Trovão et al., 2025). Entre elas, destacam-se as espécies do género *Chlorella*, pela sua notável versatilidade metabólica, uma vez que podem crescer em condições autotróficas, mixotróficas ou heterotróficas, adaptando-se a diferentes fontes de carbono e energia. Essa plasticidade fisiológica torna-as organismos modelo para a produção de biomassa de elevado valor acrescentado. Neste contexto, a variação do rácio carbono/azoto (C/N) surge como um dos principais fatores a influenciar o metabolismo e a composição bioquímica da biomassa, permitindo direcionar o cultivo para a acumulação de compostos de interesse, como proteínas ou amido.

Para induzir as microalgas à acumulação de compostos como o amido e as proteínas, e alcançar uma maior produção de biomassa, podem ser adotadas diferentes estratégias de cultivo. Uma delas é o cultivo em condições heterotróficas, nas quais as microalgas utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Neste contexto, as espécies do género *Chlorella*

destacam-se pela sua capacidade de crescer tanto em condições autotróficas, utilizando luz e CO<sub>2</sub>, como em condições heterotróficas, nas quais recorrem a fontes de carbono orgânico, o que permite um crescimento rápido, elevadas concentrações de biomassa, melhorar o teor proteico e reduzir os custos de produção.

Quando comparado com os outros dois modos de cultivo, o cultivo heterotrófico apresenta vantagens significativas: (i) permite alcançar taxas de crescimento e produtividade celular mais elevadas; (ii) não requer iluminação, simplificando o design do sistema; (iii) pode ser realizado em fermentadores selados e estéreis, prevenindo a contaminação ambiental; e (iv) possibilita obter elevadas concentrações de biomassa, facilitando a colheita e reduzindo os custos operacionais (Cai et al., 2022). Estas características permitem produzir biomassa com composição controlada, otimizando a acumulação de macromoléculas como proteínas, lípidos ou hidratos de carbono, de acordo com as condições abióticas aplicadas.

O amido e os lípidos constituem os principais compostos de armazenamento de carbono e energia nas microalgas, cuja acumulação se intensifica sob condições de stresse nutricional, especialmente em situações de limitação de azoto ou fósforo (Vonlanthen et al., 2015). Em espécies como *Chlorella sorokiniana*, o amido atua como a principal reserva de carbono durante as fases de crescimento com disponibilidade suficiente de azoto, garantindo uma elevada eficiência na captação e armazenamento de energia. No entanto, quando o azoto se esgota, a célula redireciona o fluxo de carbono para a síntese de lípidos, acompanhada pela degradação progressiva do amido, refletindo uma partição dinâmica do carbono entre ambos os compostos de reserva (Li et al., 2015; Takeshita et al., 2014).

A acumulação de amido em *Chlorella* é frequentemente induzida como resposta fisiológica ao stresse ambiental ou nutricional, embora um excesso de stresse possa afetar negativamente o crescimento celular. Por este motivo, têm sido desenvolvidas estratégias de cultivo controladas que permitem equilibrar o crescimento e a acumulação de reservas, entre as quais se destaca a variação do rácio carbono/azoto (C/N). Estudos recentes demonstraram que uma relação C/N elevada favorece o crescimento celular, enquanto uma relação C/N baixa estimula a síntese proteica em *C. sorokiniana* (Chen et al., 2025). Além disso, uma estratégia de fornecimento de azoto em duas fases (ajustando o rácio C/N de 18 para 6) permite aumentar simultaneamente o teor proteico e o rendimento total de biomassa (Chen et al., 2025).

Chi et al. (2023) propuseram um processo de cultivo heterotrófico em duas fases para modular a composição bioquímica da *Chlorella*. Na primeira fase, promove-se a acumulação de amido através de um fornecimento abundante de glicose e de uma quantidade limitada de azoto, enquanto na segunda fase se estimula a conversão parcial do amido em proteínas, aumentando a disponibilidade de azoto. Deste modo, é possível obter uma biomassa com elevado teor de amido e de proteínas, adequada para aplicações alimentares e industriais. Além disso, os grânulos de amido produzidos por *Chlorella* apresentam uma estrutura semicristalina complexa, composta por regiões helicoidais, cristalinas e lamelares, que determinam propriedades tecno-funcionais relevantes, como a viscosidade, a digestibilidade e a retrogradação do polissacárido (Chi et al., 2023; Takeshita et al., 2014).

Como estratégia de trabalho, propõe-se realizar um cultivo heterotrófico de *Chlorella sorokiniana* (estirpe branca), com o objetivo de induzir a acumulação de amido e avaliar de que forma a variação na relação carbono/azoto (C/N) afeta a composição proteica da biomassa. Esta abordagem baseia-se nos resultados obtidos por Xiao et al. (2022), que desenvolveram um processo simples e eficaz de cultivo em duas fases com *Chlorella sp.* em condições heterotróficas, direcionado para a produção de biomassa rica em proteínas. Na primeira fase, a microalga cultivada com 40 g/L de glicose e 1 g/L de ureia atingiu uma elevada densidade celular e acumulou amido sob condições de limitação de azoto. Posteriormente, na segunda fase, a conversão parcial do amido em proteínas foi ativada através da regulação positiva de genes-chave envolvidos na biossíntese proteica, resultando num aumento significativo do teor proteico.

Chen et al. (2025) avaliaram o efeito de diferentes relações C/N no crescimento e na composição celular de *Chlorella sorokiniana*. Os autores demonstraram que o ajuste do rácio C/N de 18 para 6, através de uma estratégia de fornecimento de azoto em duas fases, possibilitou aumentar simultaneamente o teor proteico e o rendimento celular, alcançando 58,6 % de proteína em peso seco e 87 g L<sup>-1</sup> de biomassa. Estes resultados evidenciam que o controlo da relação carbono/azoto constitui uma ferramenta eficaz para modular a acumulação de compostos de interesse em microalgas cultivadas heterotroficamente.

Durante o estágio desenvolvido na empresa Allmicroalgae, foi possível integrar o laboratório de cultivo heterotrófico de microalgas, onde se observaram os ensaios de cultivo heterotrófico realizados com *Chlorella*. Nesta fase, foi adquirida experiência na medição de

parâmetros de crescimento, na execução de ensaios sob condições estéreis e no manuseamento do material de cultivo.

Como parte das atividades, foi desenvolvido um ensaio experimental em escala laboratorial, com o objetivo de avaliar o efeito da variação do rácio C/N sobre a acumulação de amido e de proteína em cultivos heterotróficos de *Chlorella* (estirpe branca, correspondente à espécie *Chlorella sorokiniana*). Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL, sob condições controladas de agitação e temperatura. As determinações de amido foram efetuadas no laboratório da empresa, enquanto a análise de proteínas foi realizada externamente no GreenColab.

O objetivo desta primeira parte do trabalho foi analisar a influência da variação do rácio C/N no metabolismo de *Chlorella sorokiniana* cultivada heterotroficamente, de forma a identificar a condição que favorece a acumulação de amido e otimize a composição proteica da biomassa, servindo como base para a sua posterior avaliação tecno-funcional na Parte II deste documento.

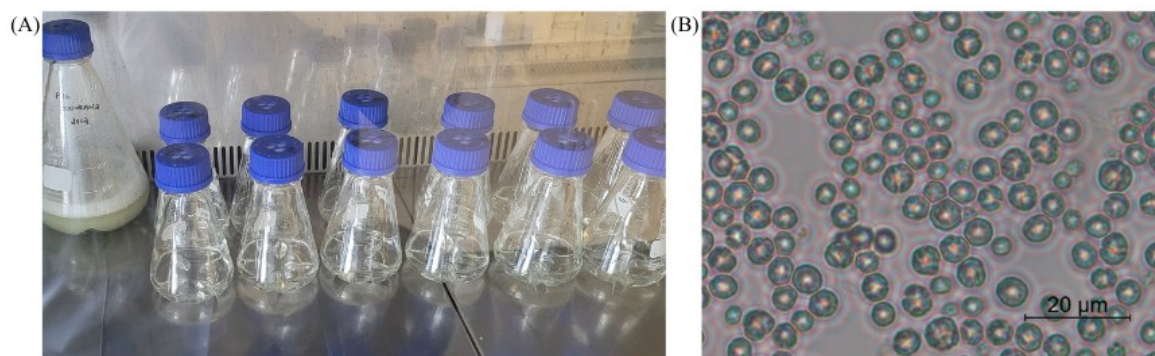
## 2.2. Materiais e métodos

### 2.2.1. Desenho experimental e condições de cultivo

O presente ensaio foi conduzido com base na metodologia descrita por Chen et al. (2025), com adaptações realizadas de acordo com os parâmetros técnicos e os dados de cultivo fornecidos pela empresa Allmicroalgae - Natural Products S.A. O objetivo foi avaliar o efeito de diferentes relações carbono/azoto (C/N) sobre o crescimento celular e analisar de que forma este influencia o teor de amido e de proteína na biomassa.

A microalga *Chlorella sorokiniana*, previamente descrita como uma estirpe de elevado teor proteico, foi cultivada sob condições heterotróficas. As soluções-mãe de glicose ( $500 \text{ g L}^{-1}$ ) e de sulfato de amónia ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) foram preparadas como fontes de carbono e de azoto, respetivamente. A partir destas soluções, formularam-se meios de cultivo com relações C/N de 2,5; 6; 12 e 24, considerando-se o rácio 2,5 como condição de controlo. Os volumes de cada solução foram ajustados de modo a obter as concentrações desejadas, completando-se o volume final de 50 mL com água destilada estéril.

O ensaio foi realizado em frascos Erlenmeyer de 50 mL, distribuídos em duas etapas principais: fase de crescimento e fase de indução. Durante a fase de crescimento, os cultivos foram incubados num meio contendo 15 g L<sup>-1</sup> de glicose e 1,68 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amónia, a 30 °C e 200 rpm, sob condições de escuridão.



**Figura 1.** Etapa de inoculação do cultivo de *Chlorella*. (A) Inoculação sob condições controladas de temperatura, agitação e escuridão. (B) Microscopia ótica das células de *Chlorella* durante a fase de inoculação (barra = 20 µm).

Na fase de indução, o meio foi ajustado para 10 g L<sup>-1</sup> de glicose e concentrações variáveis de sulfato de amónio, definidas de acordo com as relações C/N estabelecidas (tabela 1), que variaram entre 0,14 e 1,325 g L<sup>-1</sup>. As condições de temperatura, agitação e escuridão foram mantidas constantes durante toda a fase de indução.

**Tabela 1.** Condições experimentais do cultivo heterotrófico de *Chlorella* com variação do rácio C/N.

Fase de Crescimento (50 mL)			Fase de Indução (Solução adicionada, mL)		
	Solução	Solução	Solução	Solução	Água
Rácio	Glicose ( mL)	SA (mL)	Glicose ( mL)	SA (mL)	(mL)
2.5	1.5	1.98	1	1.32	0
6	1.5	1.98	1	0.56	0.76
12	1.5	1.98	1	0.28	1.04
24	1.5	1.98	1	0.14	1.18

**Soluções estoque:** Glicose 500 g/L; Sulfato de amónia 50 g/L

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Trovão et al. (2025). As amostras foram recolhidas às 0, 24, 48 e 55 horas de cultivo, e em cada ponto de amostragem mediu-se a densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) (Genesys 10S UV-Vis®; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.).

Foram igualmente efetuadas observações por microscopia ótica (Axio Scope A1®, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemanha), determinada a concentração de glicose com um glucómetro portátil, e, quando necessário, a concentração de amónio através de um kit colorimétrico (Sera GmbH®, Heinsberg, Alemanha).

No início da fase de indução, às 48 horas, ajustaram-se as concentrações de glicose e de amónia de acordo com as condições experimentais estabelecidas. O cultivo foi mantido por um total de 55 horas. As amostras foram centrifugadas e congeladas para posterior determinação dos teores de amido e de proteína.

#### 2.2.2. Determinação de amido

O teor de amido foi determinado segundo o método descrito por McCready et al. (1950), com modificações adaptadas às condições do laboratório e às características da estirpe utilizada (*Chlorella* branca). Foram recolhidos 2–5 mL da suspensão algal por centrifugação a 3 000 g durante 5 minutos, e os sedimentos foram armazenados a –20 °C até à análise.

Para a disrupção celular, utilizou-se um misturador multifuncional com modo vórtex (*Intelli-Mixer RM-2L*, ELMi Ltd., Riga, Letónia) com 0,5 mL de microesferas de vidro (0,14–0,39 mm) durante 4 minutos a 2 700 rpm, na presença de 0,25 mL de água destilada.

Dado que se trabalhou com *Chlorella* branca, uma estirpe sem pigmentos clorofílicos, a extração de pigmentos foi realizada apenas uma vez, utilizando 4 mL de etanol a 80 % (v/v) e aquecendo durante 15 minutos a 68 °C. A hidrólise total do amido foi efetuada adicionando-se 3,3 mL de ácido perclórico a 30 % (v/v) ao sedimento, seguida de agitação durante 15 minutos a 25 °C e centrifugação. Este procedimento foi repetido três vezes, combinando-se os extratos e ajustando o volume final a 10 mL com água destilada.

Posteriormente, retiraram-se 0,5 mL do extrato, que foram arrefecidos a 0 °C, aos quais se adicionaram 2,5 mL da solução de antrona (preparada com 2 g de antrona em 1 L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72 % v/v). A mistura foi agitada e mantida em banho-maria a 100 °C durante 8 minutos, sendo

depois arrefecida a 20 °C. A absorvância foi medida a 625 nm, utilizando glicose como padrão de calibração.

Os valores obtidos a partir da curva de calibração da glicose foram multiplicados por 0,90 para calcular os equivalentes de amido, corrigindo a diferença de massa molecular entre a glicose (180 g·mol<sup>-1</sup>) e o monómero anidro de glicose no amido (162 g·mol<sup>-1</sup>). O teor de amido foi expresso como percentagem da massa seca da biomassa (% m/m, base seca), de acordo com a seguinte relação:

$$\text{Amido (\%)} = \frac{C_{\text{glu}} \times 0,90 \times V_{\text{final}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (2.2.2.1)$$

Onde  $C_{\text{glu}}$  corresponde à concentração de glicose (mg·mL<sup>-1</sup>) obtida a partir da curva de calibração,  $V_{\text{final}}$  é o volume final do extrato (mL) e  $m_{\text{amostra}}$  representa a massa da biomassa seca utilizada (mg).

### 2.2.3. Conteúdo de proteínas

O teor de azoto foi quantificado por análise elementar (*Vario EL III®*, *Elementar Analyser System GmbH, Hanau, Alemanha*), realizada pelo GreenColab. Este procedimento permitiu estimar o teor de proteína de cada amostra, multiplicando o teor de azoto por um fator de 6,25 (Trovão et al., 2025).

### 2.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software R (versão 4.5.0). O efeito do rácio carbono/azoto (C/N) nos teores de amido e proteína foi avaliado por análise de variância de um fator (ANOVA). A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Shapiro–Wilk e Levene. Quando os pressupostos da ANOVA não foram cumpridos, foi utilizado o teste de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni. As comparações múltiplas em análises paramétricas foram realizadas com o teste de Tukey. O nível de significância foi  $p < 0,05$ .

## 2.3. Resultados e discussão

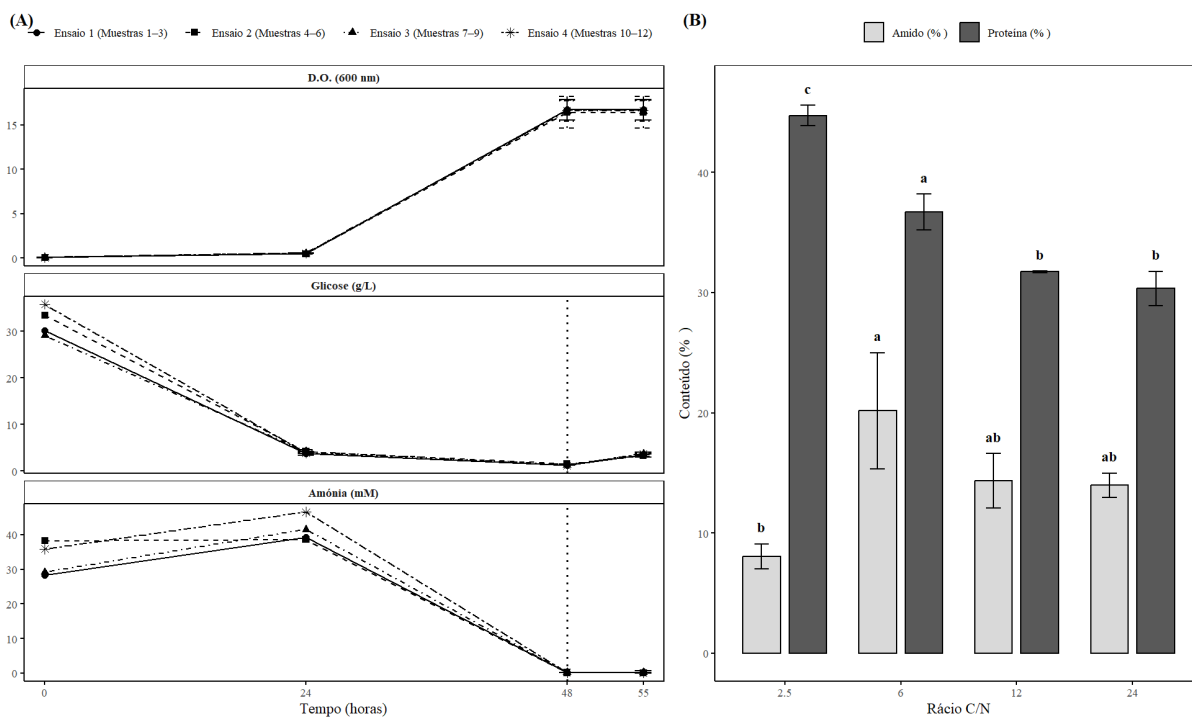
A ANOVA indicou que a relação C/N teve um efeito significativo sobre o amido ( $p = 0,005$ ). No entanto, o teste de Tukey mostrou que apenas a comparação entre o controlo (C/N 2,5) e a condição C/N 6 foi significativa, com um aumento do amido de  $8,05 \pm 1,05$  % no

controle para  $20,2 \pm 4,84$  % em C/N 6. As diferenças entre as condições C/N 12 e C/N 24 não foram estatisticamente significativas.

Relativamente ao teor proteico, a ANOVA revelou um efeito significativo da relação C/N ( $p < 0,001$ ). Observou-se uma diminuição do teor de proteína à medida que a relação C/N aumentou. O teste de Dunn, com correção de Bonferroni, identificou uma diferença significativa entre o controle ( $44,7 \pm 0,85$  %) e a condição C/N 24 ( $30,4 \pm 1,42$  %), confirmando que a limitação de azoto reduziu o teor proteico nesta condição. As comparações do controle com as condições C/N 6 e C/N 12 apresentaram valores médios inferiores, embora sem significância estatística.

Com base nos resultados combinados (aumento significativo do amido e redução moderada da proteína) a condição C/N 6 foi selecionada para o cultivo no fermentador de 5 L. Nesta escala, os valores obtidos não corresponderam ao desenho experimental realizado previamente: a biomassa produzida no fermentador apresentou cerca de 24 % de amido e  $\approx 41,9$  % de proteína, valores mais próximos dos do controle do que dos registados para C/N 6 em pequena escala. Além disso, ambos os valores foram inferiores aos observados na biomassa padrão (WCPA:  $\sim 30$  % de amido;  $\sim 47$  % de proteína). Estes resultados indicam que a etapa de indução não produziu o mesmo efeito no reator.

Os resultados obtidos nos Erlenmeyer permitem identificar quais as condições que efetivamente alteraram a composição da biomassa, e a análise estatística mostrou que apenas algumas comparações apresentaram significância após os testes pós-hoc. No caso do amido, apenas a condição C/N 6 demonstrou um aumento comprovado em relação ao controle. Para a proteína, a diferença significativa observada apenas em C/N 24 confirma que a redução do teor proteico só foi suficientemente pronunciada na condição de maior limitação de azoto, o que está em consonância com descrições anteriores sobre a resposta metabólica de *Chlorella* em condições de limitação de N (Chen et al., 2025).



**Figura 2.** Crescimento celular, consumo de substratos e composição da biomassa de *Chlorella* antes e após a fase de indução sob diferentes relações C/N. (A) Variação da densidade ótica (D.O. 600 nm), da concentração de glicose e da amônia ao longo da fase de indução. (B) Conteúdo percentual de proteína e amido na biomassa colhida após a indução. Os valores representam médias  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 3$ ); letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Ao comparar estes resultados com os do fermentador, observa-se que o padrão identificado em pequena escala não foi reproduzido. A composição da biomassa aproximou-se dos valores do controlo, sugerindo que a intensidade efetiva da limitação de azoto no reator foi inferior à alcançada nos Erlenmeyer. Este comportamento está de acordo com o relatado na literatura para processos heterotróficos de *Chlorella*, nos quais diferenças na mistura, transferência de oxigénio, cinética de consumo de azoto e gradientes locais podem alterar a resposta metabólica quando o processo é escalonado para maiores volumes (Zhang et al., 2025).



### **3. PARTE II – Análise das Propriedades Tecno-funcionais da Biomassa de *Chlorella***

#### 3.1. Introdução

À medida que cresce a procura por ingredientes funcionais sustentáveis, as proteínas de microalgas emergem como alternativas promissoras às proteínas tradicionais de origem animal e vegetal (Garcia et al., 2018; Ursu et al., 2014). A tecno-funcionalidade das proteínas refere-se às suas propriedades físico-químicas que influenciam diretamente o processamento e as características sensoriais dos alimentos, indo além do seu valor nutricional. Essas propriedades afetam de forma significativa a textura, viscosidade, palatabilidade e sensação na boca dos produtos alimentares. De modo geral, os atributos tecno-funcionais classificam-se em propriedades de superfície (por exemplo, solubilidade, emulsificação e formação de espuma) e propriedades hidrodinâmicas (como gelificação, viscosidade, espessamento e texturização) (J. Zheng et al., 2025).

A atividade superficial, incluindo as propriedades espumante e emulsionante, constitui uma característica tecno-funcional essencial em sistemas alimentares, associada à capacidade de certas biomoléculas de se adsorverem nas interfaces ar-água e óleo-água, reduzindo a tensão superficial e promovendo a estabilização das estruturas formadas. Nas microalgas, a presença concomitante de proteínas, glicoproteínas, pigmentos e carboidratos contribui para uma elevada eficiência na formação e estabilização de interfaces, frequentemente comparável ou superior à observada em proteínas alimentares convencionais, como o isolado de proteína de soro de leite. Essa sinergia entre os diferentes componentes macromoleculares evidencia o potencial das microalgas como ingredientes multifuncionais na formulação de produtos alimentares (Garcia et al., 2018).

A gelificação, por sua vez, é uma propriedade determinante para a textura de diversos produtos alimentares, resultante da formação de redes tridimensionais estáveis após processos de desnaturação e interação entre grupos funcionais de biomoléculas. Em sistemas proteicos, o aquecimento promove a exposição de regiões reativas que, ao interagirem entre si, originam estruturas viscoelásticas responsáveis pela firmeza e elasticidade dos géis. No caso das microalgas, embora os estudos sobre suas propriedades gelificantes ainda sejam limitados, evidências indicam que extratos ricos em proteínas e outros compostos macromoleculares podem formar géis com resistência significativa, dependendo da concentração proteica e das condições de processamento (Garcia et al., 2018).

As propriedades tecno-funcionais das proteínas de microalgas englobam, portanto, a sua capacidade de atuar como agentes emulsionantes, espumantes e gelificantes, desempenhando um papel central na formulação e estabilidade de diferentes sistemas alimentares. Essas funções derivam da estrutura anfifílica e flexível das proteínas, que lhes permite interagir de forma eficaz nas interfaces óleo-água e ar-água, reduzindo a tensão superficial e formando películas interfaciais estáveis. A magnitude dessas propriedades depende de fatores intrínsecos, como a conformação e a composição aminoacídica, e extrínsecos, como o pH, a temperatura e a força iônica do meio (J. Zheng et al., 2025).

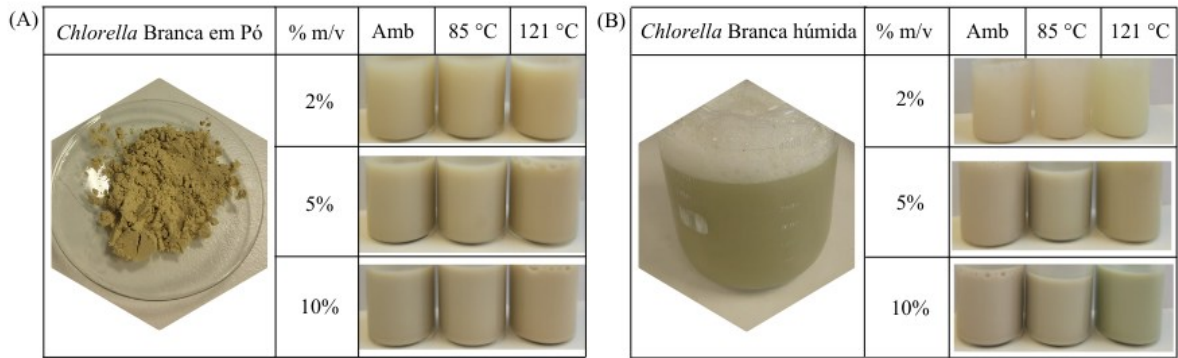
De modo geral, as proteínas de microalgas destacam-se pelo seu elevado potencial funcional quando comparadas a proteínas convencionais, apresentando solubilidade elevada, boa estabilidade e comportamento viscoelástico favorável. Essa versatilidade torna-as candidatas promissoras como ingredientes multifuncionais na indústria alimentar, capazes de substituir ou complementar proteínas tradicionais em emulsões, espumas e géis. O avanço das estratégias de cultivo (mixotrófico e heterotrófico) e das abordagens biotecnológicas, como a engenharia metabólica e a otimização de biorreatores, tem aumentado a produção e a aplicabilidade dessas proteínas, reforçando o seu papel em produtos inovadores e sustentáveis (Garcia et al., 2018; Gouda et al., 2022).

A análise das propriedades tecno-funcionais da biomassa de WC teve como objetivo avaliar o seu comportamento em meio aquoso e o seu potencial de aplicação como ingrediente funcional em alimentos. As amostras foram submetidas a diferentes tratamentos térmicos e concentrações, de forma a estudar o efeito dessas variáveis nas propriedades de solubilidade, emulsificação, gelificação e pH. Adicionalmente, foi realizada uma comparação entre a biomassa “standard” e uma biomassa cultivada em condições modificadas (fornecida pela empresa), com o objetivo de analisar possíveis diferenças no desempenho quanto às propriedades tecno-funcionais.

### 3.2. Materiais e métodos

#### 3.2.1. Preparação das amostras (concentração e tratamento térmico)

Foram preparadas amostras de WC em duas formas distintas: biomassa em pó, fornecida diretamente pela empresa a partir do seu stock de produto comercial, e biomassa húmida (em forma de pasta). Para cada tipo de biomassa, foram preparadas soluções em três concentrações (% p/V): 2%, 5% e 10%, diluindo-se a biomassa em água destilada.



**Figura 3.** Preparação das amostras *Chlorella* branca em pó (A) e húmida (B) preparadas em diferentes concentrações (2, 5 e 10 % m/v) e submetidas a distintos tratamentos térmicos (Ambiente, 85 °C e 121 °C).

As soluções foram submetidas a três condições térmicas distintas: temperatura ambiente (controlo), 85 °C e 121 °C. O tratamento a 85 °C foi realizado em banho-maria durante 40 minutos, seguido de arrefecimento imediato em banho de gelo. Já o tratamento a 121 °C foi efetuado em autoclave durante 15 minutos, com posterior arrefecimento até temperatura ambiente. Algumas amostras foram analisadas no próprio dia da preparação, enquanto outras foram conservadas sob refrigeração até ao momento da análise.

Adicionalmente, este mesmo protocolo foi utilizado para a comparação entre a biomassa standard e a biomassa obtida sob condições de cultivo modificadas, com o objetivo de avaliar o impacto da variação do rácio C/N nas propriedades tecno-funcionais. Para esta comparação, foram utilizadas amostras a 3% (m/v), tratadas nas temperaturas de 25 °C (ambiente) e 85 °C. As propriedades tecno-funcionais avaliadas incluíram solubilidade, estabilidade de emulsão e capacidade gelificante.

### 3.2.2. Solubilidade

A solubilidade da biomassa de WC foi determinada de acordo com o protocolo interno fornecido pela empresa, com o objetivo de quantificar a fração solúvel da amostra em meio aquoso. Para isso, foi preparada uma solução da biomassa a uma concentração definida (% m/V), dissolvendo-se a quantidade correspondente em água destilada. A mistura foi mantida sob agitação magnética durante 30 minutos para garantir a homogeneidade.

Em seguida, foram retirados 5 mL da solução e transferidos para um tubo de ensaio de 10 mL. A amostra foi homogeneizada num vortex durante 30 segundos e centrifugada a 1800

× g durante 15 minutos. O sobrenadante obtido foi cuidadosamente transferido para um prato de pesagem previamente limpo e seco. O prato contendo o sobrenadante foi colocado num forno a 100 °C por um período mínimo de 1 hora, até a evaporação completa do solvente (Van De Walle et al., 2025).

O peso seco do sobrenadante ( $m_{ss}$ ) foi determinado pela diferença entre o peso final do prato contendo o resíduo seco e o peso do prato vazio, conforme a Equação (8.2.2.1):

$$m_{ss} = m_{pf} - m_{pv} \quad (8.2.2.1)$$

Onde  $m_{pf}$  corresponde ao peso do prato com o sobrenadante seco (g) e  $m_{pv}$  ao peso do prato vazio (g).

O índice de solubilidade em água (ISA) foi calculado como a razão entre o peso seco do sobrenadante e a massa total de biomassa utilizada na amostra, sendo expresso em percentagem, de acordo com a Equação (8.2.2.2):

$$ISA (\%) = \left( \frac{m_{ss}}{m_t} \right) \times 100 \quad (8.2.2.2)$$

Onde  $m_{ss}$  é o peso seco do sobrenadante (g) e  $m_t$  é a massa total de biomassa de WC utilizada (g).

### 3.2.3. Emulsão

A capacidade e a estabilidade de emulsão foram determinadas com base no protocolo descrito por Jo et al. (2015), com modificações. As emulsões foram preparadas diretamente em tubos de ensaio de 40 mL, utilizando 20 mL da amostra e 20 mL de óleo de girassol, sem adição de solução salina. A mistura foi homogeneizada em vortex durante 2 minutos, a uma rotação constante (VELP Scientifica, modelo CLASSIC Advanced Vortex Mixer, Itália). Imediatamente após a homogeneização (tempo zero), foram registados o volume total da emulsão e o volume da fase aquosa separada. A estabilidade da emulsão foi monitorizada por meio da leitura direta do volume da fase aquosa em intervalos de 15 minutos, ao longo de 1 hora.

$$ES (\%) = \left( \frac{V_{total} - V_{fase\ aquosa}(t)}{V_{total}} \right) \times 100 \quad (8.2.3.1)$$

$$EC (\%) = \left( \frac{V_{total} - V_{fase\ aquosa}(t=0)}{V_{total}} \right) \times 100 \quad (8.2.3.2)$$

A capacidade de emulsão (EC%) foi calculada com base na proporção do volume emulsificado em relação ao volume total da emulsão (Equação (8.2.3.1)). A estabilidade da emulsão (ES%) foi determinada com base na variação do volume da fase aquosa ao longo do tempo, em relação ao volume total da emulsão no tempo zero, de acordo com a metodologia modificada de Jo et al. (2015), conforme a Equação (8.2.3.2).

#### 3.2.4. Capacidade gelificante

A concentração mínima de gelificação foi determinada de acordo com o método descrito por (Van De Walle et al., 2025), com modificações. Foram transferidos 5 mL de suspensão de microalgas (2–20 %, m/v) para tubos de ensaio de vidro selados, os quais foram aquecidos num banho-maria a 99 °C durante 10 minutos. Após o aquecimento, os tubos foram deixados a arrefecer à temperatura ambiente durante 1 hora e posteriormente armazenados a 4 °C durante a noite. A amostra com a menor concentração que não apresentou escoamento após 5 minutos de inversão foi considerada como a concentração mínima de gelificação.

#### 3.2.5. pH

O pH das amostras foi determinado utilizando um medidor de pH digital, com leitura direta à temperatura ambiente ( $\approx 25$  °C). As medições foram realizadas nas soluções preparadas após os diferentes tratamentos térmicos.

#### 3.2.6. Cor

A avaliação da cor das amostras foi realizada utilizando um colorímetro CR-400 (Konica Minolta), com iluminante padrão D65 e ângulo do observador de 2°. A calibração foi feita com a placa de calibração CR-A43, fornecida com o equipamento. As medições foram realizadas diretamente sobre as amostras líquidas (foram utilizadas apenas as amostras de *Chlorella* em pó), acondicionadas em copos transparentes (figura 3). As leituras foram feitas nos tempos de 0, 1, 2 e 3 dias após a preparação, com o objetivo de observar possíveis alterações de cor durante o armazenamento. As amostras foram conservadas a 4 °C entre as medições. Foram registados os valores dos parâmetros L\* (luminosidade), a\* (eixo verde-vermelho) e b\* (eixo azul-amarelo), com três repetições por condição (Pereira et al., 2024).

A partir dos valores de  $a^*$  e  $b^*$ , determinaram-se as coordenadas derivadas  $C^*$  (croma) e  $h^\circ$  (matiz), de acordo com as seguintes expressões:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (3.2.6.1)$$

$$h^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3.2.6.2)$$

Onde  $C^*$  representa a intensidade ou saturação da cor, e  $h^\circ$  o ângulo de matiz, expresso em graus, correspondendo à tonalidade percebida ( $0^\circ$  = vermelho,  $90^\circ$  = amarelo,  $180^\circ$  = verde e  $270^\circ$  = azul). A diferença total de cor entre as medições realizadas no dia 0 e no dia 3 foi calculada utilizando a fórmula de  $\Delta E_{00}$  proposta por CIEDE2000 (Commission Internationale de l'Éclairage, 2000):

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{S_C}\right) \left(\frac{\Delta H'}{S_H}\right)} \quad (3.2.6.3)$$

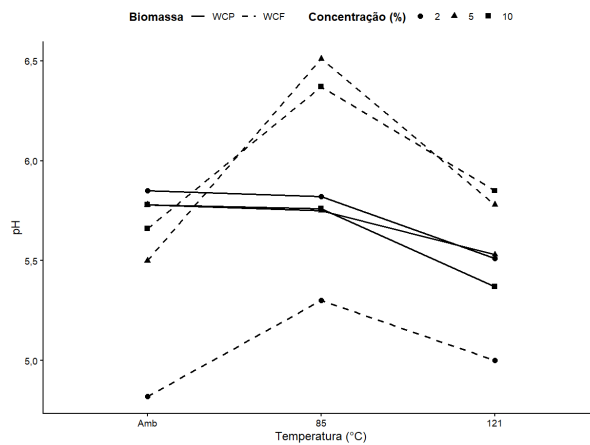
Em que  $\Delta L'$ ,  $\Delta C'$  e  $\Delta H'$  correspondem às diferenças corrigidas de luminosidade, croma e matiz, respetivamente;  $S_L$ ,  $S_C$  e  $S_H$  são fatores de ponderação que compensam variações não uniformes do espaço de cor CIELAB; e  $R_T$  é o termo de rotação que ajusta as interações entre matiz e croma.

Valores de  $\Delta E_{00} < 1,0$  indicam diferenças de cor não percecionáveis visualmente, enquanto  $\Delta E_{00}$  entre 1,0 e 2,0 são considerados percecionáveis mas aceitáveis, e  $\Delta E_{00} > 2,0$  refletem diferenças visíveis e potencialmente inaceitáveis.

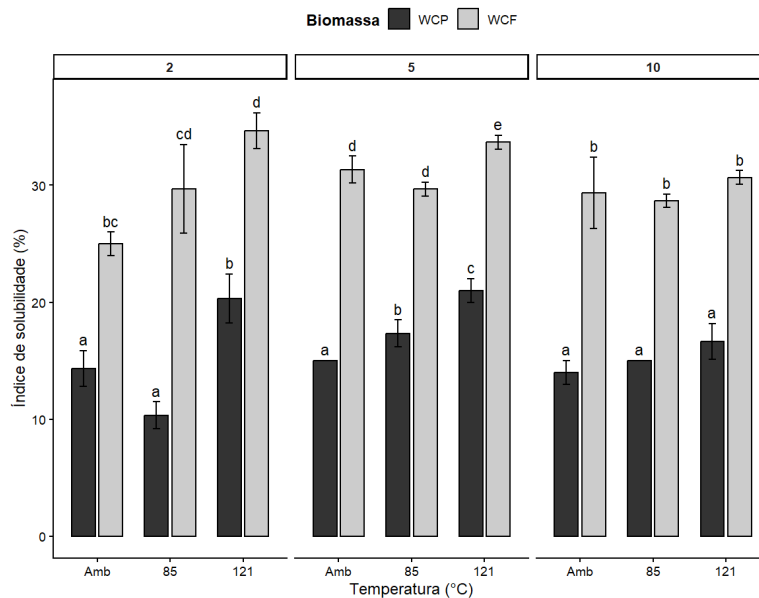
Para cada condição experimental, calcularam-se as médias e desvios-padrão dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$  e  $\Delta E_{00}$ , a partir de três repetições independentes. As médias de  $C^*$  e  $h^\circ$  foram analisadas por ANOVA de um fator (Dia), aplicada separadamente para cada combinação de concentração (2%, 5% e 10%) e temperatura de tratamento (Amb, 85 °C e 121 °C), com o objetivo de avaliar diferenças significativas ao longo do armazenamento (0–3 dias). Quando o efeito de Dia foi significativo ( $p < 0,05$ ), aplicou-se o teste de Tukey para comparar as médias entre os dias dentro de cada grupo experimental. As letras sobrescritas apresentadas nas tabelas e figuras indicam médias que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Resultados e discussão

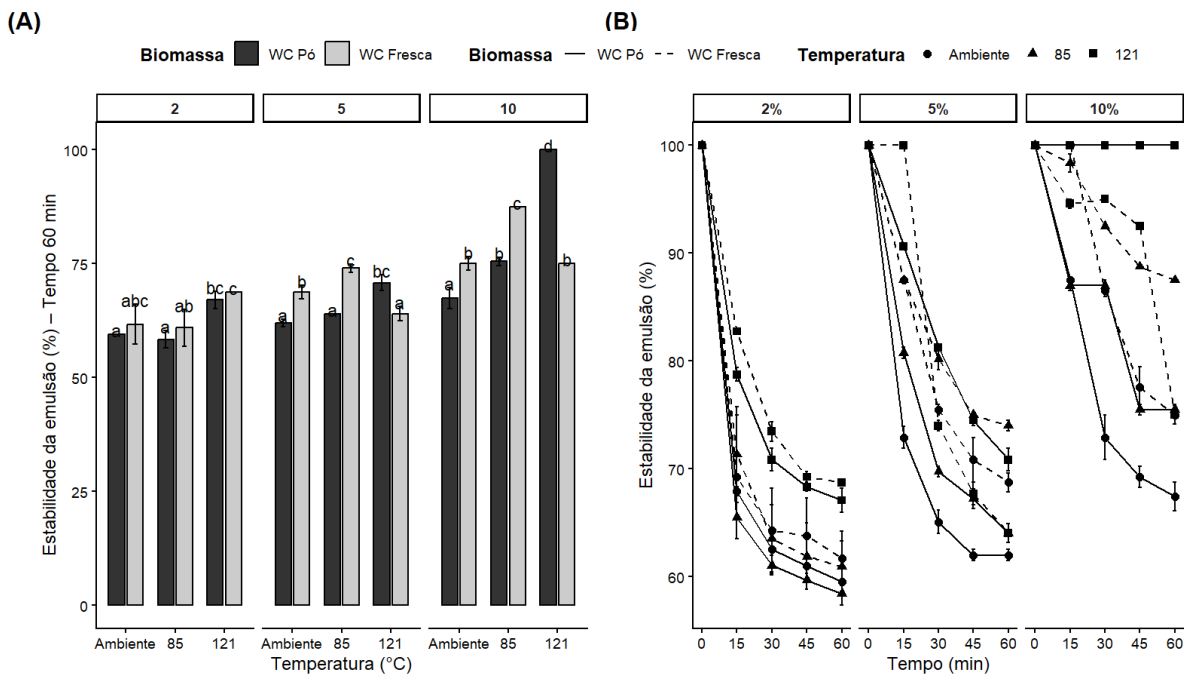
O estudo das biomassas de *Chlorella* branca (WC), nas suas formas em pó (WCP) e húmida (WCF), permitiu avaliar a influência da temperatura e da concentração sobre o índice de solubilidade e a estabilidade das emulsões. De forma geral, verificou-se que tanto o tipo de biomassa como a temperatura exerceram um efeito significativo nas propriedades funcionais, observando-se um comportamento mais favorável na biomassa húmida e em condições térmicas elevadas (figura 4).



**Figura 4.** Variação do pH da biomassa WC em função do tipo de biomassa e da temperatura após a aplicação do tratamento térmico.



**Figura 5.** Índice de solubilidade da biomassa WC em função do tipo de biomassa e da temperatura. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 3$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Estabilidade da emulsão da biomassa WC em função do tipo de biomassa e da temperatura. (A) Estabilidade da emulsão após 60 min; os valores correspondem à média  $\pm$  desvio-padrão ( $n = 3$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). (B) Evolução temporal da estabilidade da emulsão ao longo de 60 min; os dados representam apenas a tendência descritiva das médias observadas, sem análise estatística.

O índice de solubilidade apresentou diferenças significativas entre biomassas e temperaturas em todas as concentrações analisadas ( $p < 0,001$ ). Em todos os níveis avaliados (2, 5 e 10 %), a biomassa húmida (WCF) revelou valores de solubilidade superiores aos da biomassa seca (WCP), evidenciando o impacto do processo de secagem na redução da fração solúvel. Este resultado sugere que a secagem pode induzir modificações estruturais nas proteínas, diminuindo a sua capacidade de interação com a água e, conseqüentemente, a solubilidade global da biomassa (Van De Walle et al., 2024). Resultados semelhantes foram descritos por Grossmann et al. (2018), que observaram que processos de extração e liofilização influenciam o estado físico e a solubilidade das proteínas de microalgas, alterando o equilíbrio entre frações solúveis e insolúveis.

Em relação à temperatura, verificou-se um aumento gradual do índice de solubilidade até 85 °C, seguido de uma redução a 121 °C. O mesmo padrão foi observado em todas as concentrações, com valores máximos de solubilidade registados a 85 °C, especialmente na

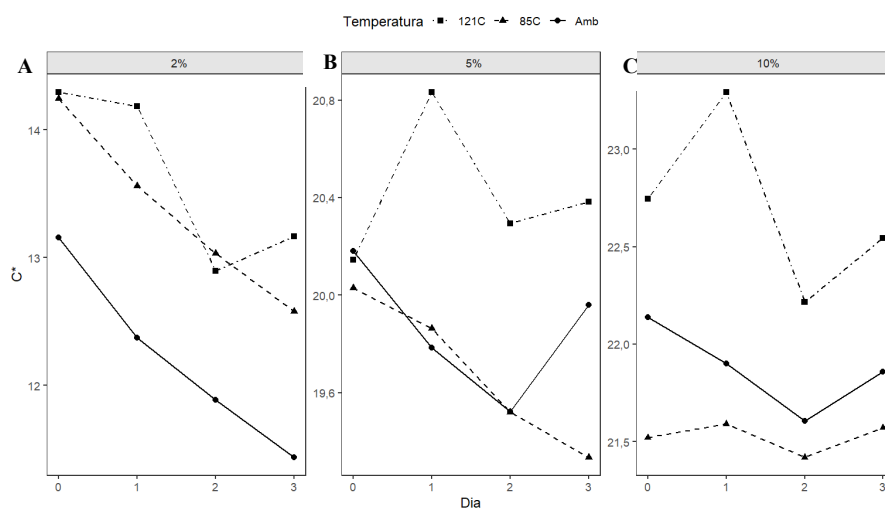
biomassa WCF. Este comportamento coincide com a variação do pH medida nas suspensões, que aumentou até 85 °C e diminuiu a 121 °C, apresentando valores consistentemente superiores para a WCF (Grossmann et al., 2018, 2019).

Grossmann et al. (2019) demonstraram que a solubilidade das proteínas extraídas de *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Nannochloropsis oceanica* depende fortemente do pH, apresentando valores máximos entre pH 5 e 7 e uma redução acentuada em meios mais ácidos, devido ao aumento da agregação proteica. Segundo os autores, esta diminuição está associada à redução da repulsão eletrostática e ao predomínio de interações hidrofóbicas, que favorecem a formação de agregados proteicos e a consequente perda de solubilidade. Assim, a variação de pH observada neste estudo pode estar associada a alterações na carga superficial e nas interações intermoleculares das proteínas após o tratamento térmico, influenciando a fração solúvel disponível (Grossmann et al., 2018, 2019).

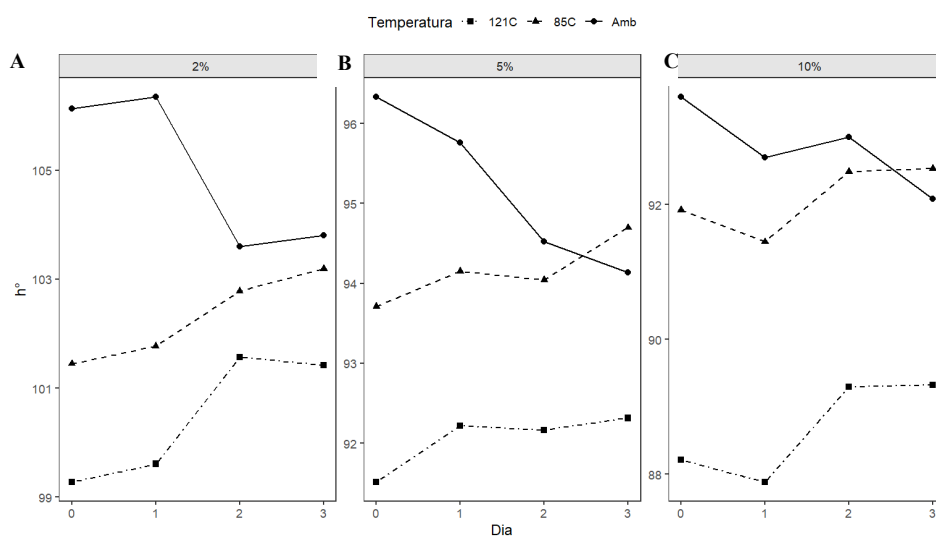
A estabilidade da emulsão variou significativamente em função da concentração e da temperatura, observando-se interações relevantes entre ambos os fatores ( $p < 0,001$ ). Em todas as condições, verificou-se que o aumento da concentração favoreceu a estabilidade, atingindo valores máximos nas emulsões preparadas com 10 % de biomassa. A 2 %, as amostras apresentaram estabilidade média entre 60 % e 66 %, sem diferenças consistentes entre biomassas. A 5 %, observou-se incremento gradual, com valores próximos de 70–76 % após aquecimento a 121 °C. Nas emulsões a 10 %, os maiores valores registaram-se também a 121 °C, destacando-se a biomassa seca (WCP), que manteve aproximadamente 100 % de estabilidade até 60 min, enquanto a biomassa húmida (WCF) apresentou valores ligeiramente inferiores, entre 75 % e 95 %. As curvas de estabilidade ao longo do tempo confirmam esta tendência, evidenciando uma diminuição mais acentuada nas emulsões de menor concentração e uma retenção mais elevada nas amostras com 10 %.

O aumento da estabilidade com a concentração e o aquecimento está associado à maior disponibilidade de compostos com propriedades emulsificantes, nomeadamente proteínas e polissacarídeos (Bleakley & Hayes, 2017; Mosibo et al., 2024). O aquecimento a 121 °C pode ter favorecido uma desnaturação parcial das proteínas, expondo regiões hidrofóbicas que promovem a adsorção na interface óleo-água e a formação de uma película interfacial mais coesa. As proteínas de *Chlorella* possuem caráter anfipático e são reconhecidas pela sua capacidade de reduzir a tensão interfacial, estabilizando emulsões óleo-em-água, comportamento que se relaciona diretamente com a solubilidade e o pH (Bleakley & Hayes, 2017; Mosibo et al., 2024; Van De Walle et al., 2024).

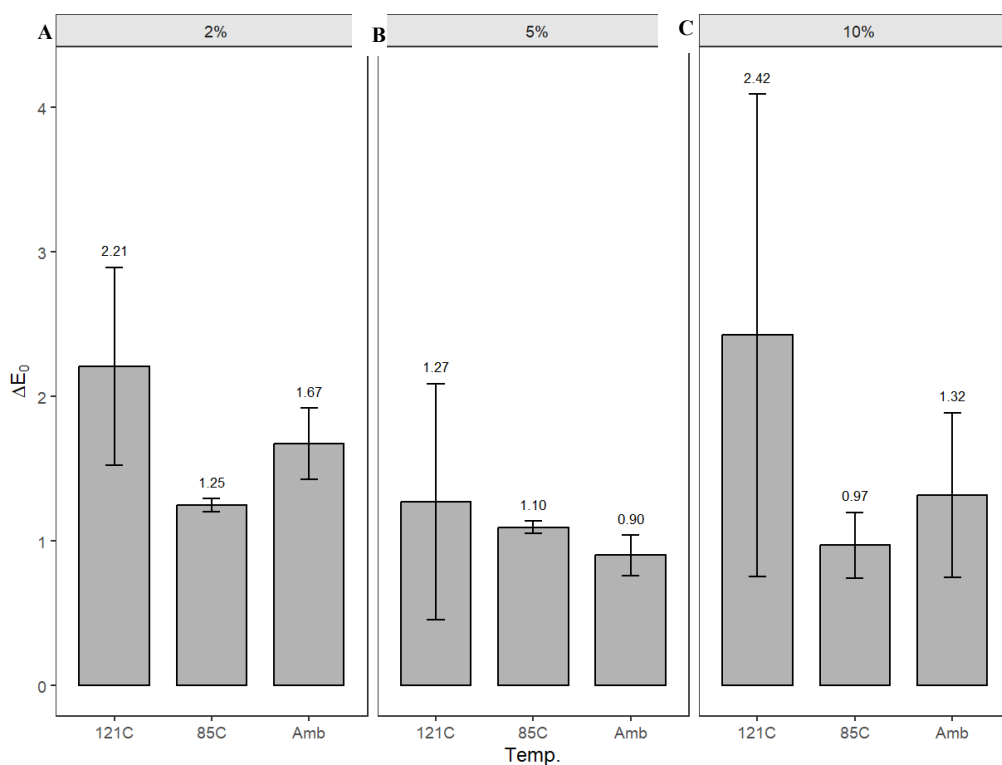
Assim, a maior estabilidade observada nas condições de maior solubilidade confirma a ligação entre ambas as propriedades. Resultados semelhantes foram reportados para extratos hidrossolúveis de *Chlorella protothecoides*, capazes de estabilizar emulsões por vários dias, com desempenho comparável ao de proteínas alimentares convencionais, como a soja ou o caseinato de sódio (Mosibo et al., 2024). De forma geral, as microalgas destacam-se como fontes alternativas às proteínas de origem animal, com potencial para aplicação como agentes emulsificantes e como veículos para compostos bioativos com propriedades antioxidantes, reforçando o valor funcional da biomassa de *Chlorella* em sistemas alimentares (Bleakley & Hayes, 2017; Mosibo et al., 2024; Wang et al., 2024).



**Figura 7.**Variação do croma (C\*) da biomassa em pó de *Chlorella* branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias), sob diferentes temperaturas (ambiente, 85 °C e 121 °C).



**Figura 8.**Variação do matiz (h°) da biomassa em pó de *Chlorella* branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias), sob diferentes temperaturas (ambiente, 85 °C e 121 °C).



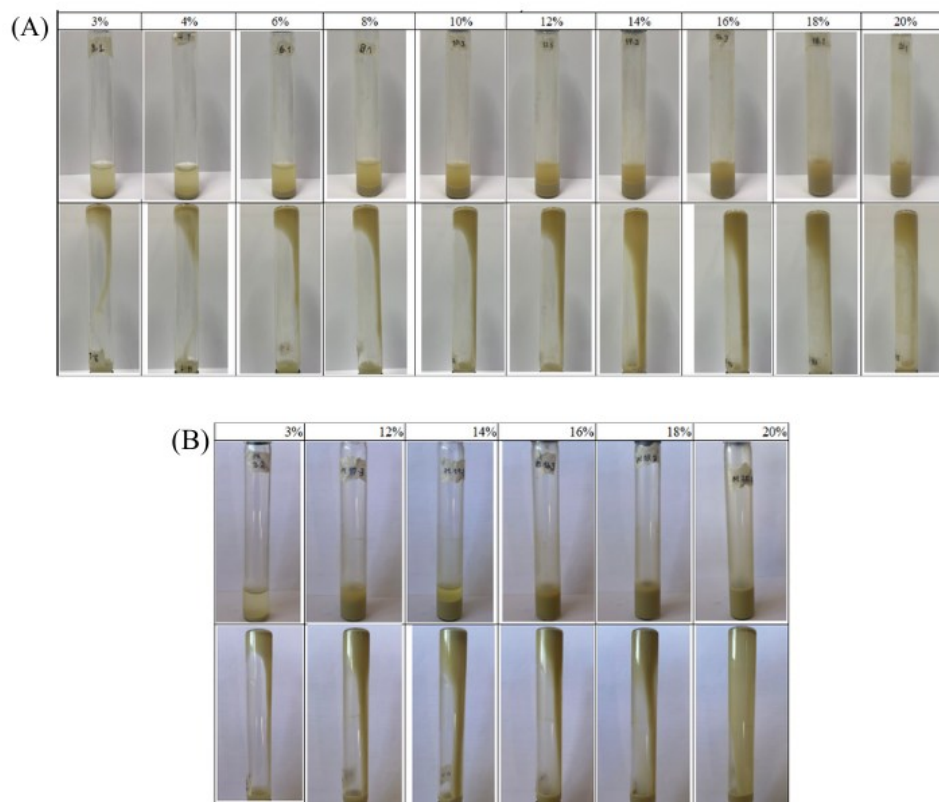
**Figura 9.** Diferença total de cor ( $\Delta E_{00}$ ) da biomassa em pó de *Chlorella* branca (WCP) entre o dia 0 e o dia 3, sob diferentes temperaturas (ambiente, 85 °C e 121 °C).

A avaliação colorimétrica das suspensões da *Chlorella* branca em pó (WCP) submetidas a três concentrações (2 %, 5 %, 10 % m/v) e a três temperaturas de tratamento (ambiente, 85 °C, 121 °C) durante armazenamento de 0 a 3 dias (figura 5) mostrou que o parâmetro C\* apresentou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) ao longo dos dias de armazenamento em 7 de 9 combinações concentração×temperatura (2 %–Amb, 2 %–85 °C, 2 %–121 °C, 5 %–85 °C, 5 %–121 °C, 10 %–Amb, 10 %–121 °C), indicando uma diminuição da saturação da cor ao longo do tempo. As condições 5 %–Amb e 10 %–85 °C não revelaram variação significativa ( $p > 0,05$ ).

Para o parâmetro  $h^\circ$ , também se verificaram diferenças significativas em 7 de 9 grupos (2 %–Amb, 2 %–85 °C, 2 %–121 °C, 5 %–Amb, 5 %–121 °C, 10 %–Amb, 10 %–121 °C); as condições 5 %–85 °C e 10 %–85 °C mantiveram-se estáveis ( $p > 0,05$ ). Os valores de  $h^\circ$  oscilaram apenas dentro de intervalos curtos (por exemplo, 99°–101° a 2 %–121 °C; 88°–89° a 10 %–121 °C). A diferença total de cor  $\Delta E_{00}$  (0-3 dias) permaneceu abaixo de 2,0 nas condições ambiente (0,90–1,67) e 85 °C (0,97–1,25), enquanto sob tratamento de 121 °C variou entre 1,27 e 2,42, sendo que 2 de 3 grupos ultrapassaram o limiar de percepção de 2,0 (figura 5).

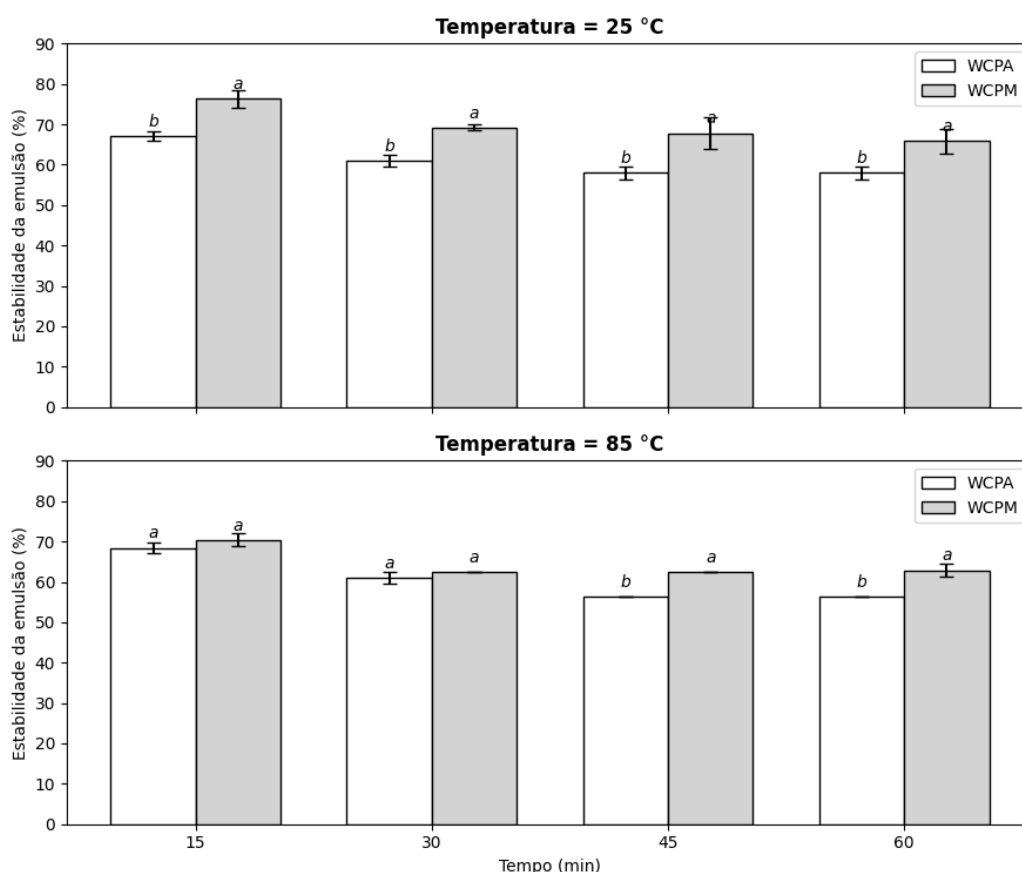
As diferenças observadas em  $C^*$  e  $h^\circ$  refletem a influência da concentração e da temperatura no comportamento cromático das suspensões de WCP. A diminuição da saturação da cor ( $\downarrow C^*$ ) ao longo do armazenamento sugere degradação ou alteração dos pigmentos presentes, bem como possível dispersão alterada das partículas da biomassa (Pathare et al., 2012; Pereira et al., 2024). As variações reduzidas no matiz ( $h^\circ < 3^\circ$ ) indicam que o tom cromático principal se manteve, apontando que a mudança foi mais de intensidade que de tonalidade (Pandiselvam et al., 2023; Pathare et al., 2012; Wijesekara & Xu, 2024).

Os valores de  $\Delta E_{00} < 2,0$  na condições (ambiente e 85 °C) indicam estabilidade visual aceitável ao longo de 3 dias, enquanto o aumento da  $\Delta E_{00}$  acima de 2,0 a 121 °C evidencia alterações visuais perceptíveis, possivelmente decorrentes de reações de escurecimento e oxidação por calor intenso. Este resultado destaca que embora a biomassa em pó apresente boa estabilidade cromática sob condições moderadas, o tratamento térmico compromete essa estabilidade, o que é relevante para aplicações alimentares que submetam a biomassa a elevadas temperaturas (Hosseinizand et al., 2018; Pereira et al., 2024).



**Figura 10.** Capacidade de gelificação das biomassas WCPA (A) e WCPM (B) em diferentes concentrações (3–20%, m/v).

A capacidade de gelificação (figura 6) foi avaliada em diferentes concentrações (3–20%, m/v) para as biomassas WCPA (A) e WCPM (B). Até à concentração máxima de 20% (m/v), não se observou formação de gel visível em nenhuma das amostras, indicando que as biomassas não desenvolveram uma estrutura suficientemente organizada para reter água e manter uma consistência semissólida (McClements, 2021; Nath et al., 2022). A biomassa modificada (WCPM), com teor de amido inferior (24%, em comparação com 30% na biomassa original), apresentou comportamento semelhante à biomassa original, sugerindo que ambas apresentam um baixo potencial gelificante sob as condições testadas. De forma geral, a ausência de gelificação até 20% (m/v) em ambas as biomassas confirma esse baixo potencial, embora possam apresentar outras propriedades tecno-funcionais relevantes, como capacidade espessante ou estabilizante, devido à presença de proteínas e polissacáridos solúveis (Nath et al., 2022; Saha & Bhattacharya, 2010).



**Figura 11.** Estabilidade da emulsão (ES%) das biomassas WCPA e WCPM em função do tempo a 25 °C e 85 °C. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas entre as biomassas (teste de Tukey HSD,  $\alpha = 0,05$ ) dentro de cada tempo e temperatura. As barras de erro representam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

A análise de variância bifatorial (ANOVA 2×4) revelou que, a 25 °C, tanto o fator Biomassa como o fator Tempo tiveram efeitos significativos sobre a estabilidade da emulsão ( $p < 0,001$ ), enquanto a interação entre ambos não foi significativa ( $p = 0,836$ ).

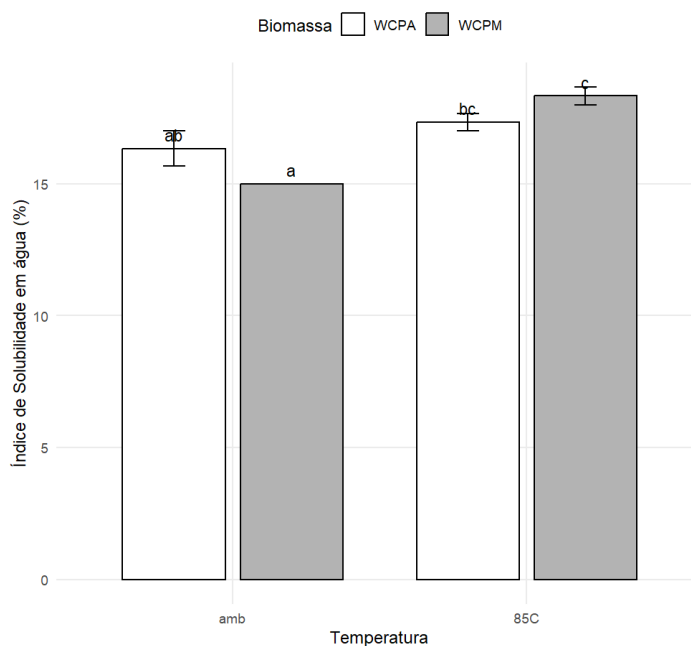
Estes resultados indicam que, a esta temperatura, o comportamento temporal da estabilidade é semelhante nas duas biomassas, embora a biomassa modificada (WCPM) apresente valores médios superiores aos da biomassa original (WCPA). Por outro lado, a 85 °C, verificou-se um efeito altamente significativo de ambos os fatores principais (Biomassa e Tempo,  $p < 0,001$ ) e uma interação significativa entre eles ( $p < 0,001$ ), sugerindo que o efeito do tempo de emulsificação sobre a estabilidade depende do tipo de biomassa sob condições térmicas elevadas.

O teste de Tukey confirmou estas tendências. A 25 °C, a WCPM apresentou valores significativamente superiores de estabilidade da emulsão em todos os tempos (15, 30, 45 e 60 min;  $p < 0,05$ ), enquanto a 85 °C as diferenças apenas foram significativas aos 45 e 60 min ( $p < 0,01$ ). Estes resultados demonstram que, embora ambas as biomassas sofram redução da estabilidade com o tempo, a WCPM mantém-se mais estável, especialmente nas etapas finais do ensaio e sob aquecimento.

Os resultados obtidos evidenciam que a temperatura e o tipo de biomassa exercem um papel determinante na estabilidade da emulsão. Segundo Mosibo et al. (2024), a estabilidade de sistemas emulsificados depende da capacidade das proteínas atuarem como agentes tensioativos, reduzindo a tensão interfacial entre as fases óleo e água e formando uma película interfacial que limita a coalescência das gotas. Em sistemas alimentares, essa película pode enfraquecer ao longo do tempo, conduzindo à separação parcial das fases. Assim, a diminuição progressiva dos valores de ES% observada neste estudo é coerente com o comportamento descrito na literatura para emulsões estabilizadas por proteínas, incluindo as de microalgas, que tendem a apresentar redução gradual de estabilidade durante o armazenamento (Bleakley & Hayes, 2017; Mosibo et al., 2024).

No entanto, a manutenção de maiores valores de estabilidade na biomassa WCPM sugere que as modificações estruturais introduzidas neste material (nomeadamente a redução do teor de amido (24%) e o teor proteico ( $\approx 41,9\%$ )) podem ter contribuído para uma maior capacidade de estabilização interfacial. As proteínas presentes na biomassa desempenham um papel importante na formação e estabilização de emulsões (Bleakley & Hayes, 2017; Mosibo et al., 2024).

A interação significativa observada a 85 °C indica que a WCPM responde de forma mais favorável ao tratamento térmico, mantendo a estabilidade mesmo após 60 min, enquanto a WCPA apresenta uma redução. Em conjunto, os dados indicam que a biomassa modificada (WCPM) apresenta melhor desempenho emulsificante e maior resistência térmica, o que representa um potencial tecnológico relevante para aplicações em sistemas alimentares e biotecnológicos que requerem estabilidade sob aquecimento prolongado.



**Figura 12.** Efeito da biomassa (WCPA, WCPM) e da temperatura (ambiente e 85 °C) sobre o índice de solubilidade em água (ISA  $\pm$  SE). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A análise de variância bifatorial (ANOVA 2 $\times$ 2) mostrou que o fator Biomassa não apresentou um efeito significativo sobre o índice de solubilidade em água (ISA) ( $F = 0,17$ ;  $p = 0,694$ ), enquanto o fator Temperatura teve um efeito significativo ( $p < 0,001$ ), indicando que o aquecimento a 85 °C aumentou de forma significativa a solubilidade em água em comparação com a condição ambiente.

Além disso, observou-se uma interação significativa entre ambos fatores ( $p = 0,021$ ), o que demonstra que a resposta ao aumento da temperatura depende do tipo de biomassa. As comparações múltiplas confirmaram diferenças significativas entre as combinações de tratamentos, com valores de ISA que aumentaram progressivamente desde WCPM-amb (15,0 %) até WCPM-85 °C (18,3 %), sendo esta última condição a que apresentou a maior

solubilidade. As letras atribuídas às médias (a–c) refletem estes contrastes, consolidando um padrão crescente de solubilidade com o aumento da temperatura, especialmente na biomassa WCPM (figura 12).

Os resultados evidenciam que a temperatura exerce um papel determinante na solubilidade em água das biomassas avaliadas. O aumento significativo do índice de solubilidade em água (ISA) a 85 °C pode ser atribuído a transformações físico-químicas induzidas pelo calor, tais como a desnaturação de proteínas, a gelatinização parcial do amido e a ruptura de ligações intermoleculares que expõem grupos hidrofílicos, aumentando a sua interação com a água (Bleakley & Hayes, 2017; Grossmann et al., 2019; Mosibo et al., 2024).

Embora o efeito principal da biomassa não tenha sido estatisticamente significativo, a interação observada sugere que a WCPM respondeu de forma mais acentuada ao tratamento térmico do que a WCPA. A biomassa WCPA apresentou um teor de amido de aproximadamente 30%, enquanto a WCPM apresentou 24% de amido e 10% de açúcares simples. Além disso, o teor de proteína, determinado a partir da quantificação do azoto e convertido pelo fator de 6,25 (Trovão et al., 2025), foi 41,85% (WCPA) e 40,94% (WCPM).

Assim, os resultados indicam que o tratamento térmico aumenta a solubilidade de ambas as biomassas. Este comportamento poderá ter implicações tecnológicas relevantes em processos que requeiram maior dispersão ou solubilização de componentes bioativos, nomeadamente em aplicações alimentares ou biotecnológicas.

#### 4. Parte III – Aplicação Alimentar da Biomassa de *Chlorella*

##### 4.1. Introdução

As microalgas, por serem alimentos ricos em lipídios, proteínas, hidratos de carbono e pigmentos, apresentam diversos benefícios nutricionais e para a saúde. Por este motivo, têm sido cada vez mais utilizadas como ingredientes em alimentos funcionais, bem como em outras aplicações, nomeadamente na indústria cosmética e em produtos agrícolas. Assim, o consumo de alimentos que contêm compostos derivados de microalgas tem permitido a sua comercialização sob a forma de superalimentos e de produtos alimentares (Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022).

A composição proteica das microalgas, como a *Chlorella*, é semelhante à das fontes proteicas tradicionais em termos do perfil total de aminoácidos, o que lhes confere um elevado potencial para utilização como ingredientes com benefícios para a saúde e como nutracêuticos. Para além do seu perfil em macronutrientes, as microalgas são ricas em compostos bioativos, tais como ácidos gordos polinsaturados (incluindo ómega-3), vitaminas (particularmente B12 e E), antioxidantes, pigmentos como a ficocianina e a astaxantina, e minerais essenciais como o ferro e o magnésio. Estes compostos conferem benefícios adicionais para a saúde, que incluem efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, bem como apoio às funções cardiovascular e hepática (Prates, 2025).

Atualmente, as microalgas produzidas são utilizadas principalmente em pré-misturas alimentares e em diversas aplicações na indústria alimentar, nomeadamente na formulação de bebidas, produtos de panificação e massas (Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022; Su et al., 2023). A adição de biomassa de microalgas a produtos alimentares constitui uma estratégia interessante para complementar a dieta com compostos biologicamente ativos (Batista et al., 2013).

Ao nível das propriedades tecno-funcionais (tais como solubilidade, capacidade emulsionante, formação de espuma e gelificação) as microalgas apresentam características que permitem a sua incorporação em diferentes matrizes alimentares, incluindo bebidas vegetais, análogos lácteos, produtos de panificação e alternativas à carne, entre outros. Nos produtos de origem láctea ou nas suas alternativas vegetais, a utilização de *Chlorella* contribui para a estabilização das emulsões e melhora a textura em boca, além de fornecer micronutrientes valiosos, como a vitamina B12 e o ferro (Prates, 2025).

A incorporação de microalgas em alimentos representa um grande desafio; contudo, os consumidores têm vindo a apostar progressivamente em novos produtos e em dietas mais diversificadas, procurando opções que integrem saúde, sustentabilidade e qualidade alimentar (Ferreira de Oliveira & Bragotto, 2022) . Estas características multifuncionais tornam as proteínas de microalgas candidatas promissoras para a formulação da próxima geração de alternativas lácteas de origem vegetal e de rótulo limpo (clean label), adaptadas tanto aos benefícios para a saúde como à aceitação do consumidor (Prates, 2025). Com base na crescente procura global e nos dados de investigação disponíveis, que enfatizam a importância das microalgas como fonte sustentável de ingredientes ricos em nutrientes, a comunidade científica tem vindo a dedicar uma atenção crescente ao estudo dos seus potenciais usos na indústria alimentar (Naik et al., 2024).

Neste contexto, o presente estudo foi realizado na empresa Allmicroalgae, no âmbito de um estágio curricular, com o propósito de avaliar uma aplicação prática da biomassa de *Chlorella* branca. A definição da matriz alimentar iniciou-se com reuniões entre a equipa de estágio e o Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa, nas quais foram discutidas diferentes propostas de aplicação da *Chlorella* branca. A partir dessas reuniões, identificou-se a oportunidade de incorporar a biomassa numa bebida vegetal, considerando o seu potencial nutricional e funcional.

A alimentação moderna tem evoluído no sentido de oferecer produtos mais saudáveis, sustentáveis e convenientes, sendo o desenvolvimento de alimentos naturais com benefícios para a saúde uma direção estratégica para a indústria alimentar (Zheng et al., 2024). A incorporação de *Chlorella* em alimentos visa não apenas enriquecer o seu perfil nutricional, mas também proporcionar propriedades funcionais com potencial benefício para a saúde humana.

Com base neste enquadramento, foram analisadas bebidas vegetais já existentes no mercado e selecionados ingredientes compatíveis com o perfil funcional pretendido. A formulação evoluiu a partir de sucessivas pré-formulações realizadas na empresa, nas quais os ingredientes foram ajustados de acordo com a aceitabilidade sensorial e a composição nutricional teórica. Particular atenção foi dada ao teor de fibra, vitamina B12 e proteína, de modo a garantir um produto equilibrado e funcional. Tendo em conta as propriedades nutricionais e funcionais da *Chlorella* e considerando as exigências do consumidor moderno por alimentos saudáveis e sensorialmente agradáveis, foram selecionados ingredientes de base vegetal que apresentassem boa compatibilidade com a biomassa de *Chlorella* branca.

Esta escolha teve como objetivo assegurar a viabilidade tecnológica e, simultaneamente, enfrentar os principais desafios sensoriais associados às microalgas, nomeadamente o sabor característico, a cor intensa e a textura residual. Estes fatores foram considerados desde o início do processo de formulação, com o intuito de desenvolver um produto equilibrado, funcional e sensorialmente bem aceite, conforme demonstrado em estudos prévios sobre aplicações da *Chlorella* em panificação, bebidas e suplementos alimentares (Zheng et al., 2024).

## 4.2. Materiais e métodos

### 4.2.1. Incorporação da biomassa experimental

A formulação seguiu uma abordagem teórico-experimental. Inicialmente, foram realizadas simulações de tabelas nutricionais com diferentes proporções de *Chlorella*, com o objetivo de atingir um equilíbrio adequado entre energia, proteína, fibra, hidratos de carbono e gordura. A composição nutricional teórica foi calculada com base nos dados fornecidos nos rótulos comerciais dos ingredientes. Posteriormente, foram realizados ajustes com base em ensaios laboratoriais e validação sensorial informal, conduzida com colaboradores da empresa.



**Figura 13.** Biomassa *Chlorella sp.* (WC) utilizada na formulação da bebida.

Fonte: Allmicroalgae.

Com base nesses testes preliminares realizados na própria empresa, foi definida a inclusão de 3% de WC na formulação final da bebida; a biomassa utilizada (WC) na formulação é ilustrada na Figura 13. Esse valor representou um compromisso entre aceitação sensorial e contribuição nutricional, garantindo um teor de incorporação de biomassa microalgal (WC) suficiente para conferir ao produto características nutricionais e tecno-funcionais de interesse, bem como a cor característica, sem comprometer o sabor e a textura da bebida. A seleção desse nível de inclusão foi discutida com a equipa de Investigação e Desenvolvimento da empresa

Allmicroalgae, sendo considerada adequada para aplicações em produtos vegetais líquidos. Estudos prévios também relatam que teores mais elevados de microalgas podem comprometer a aceitação sensorial (Ferreira et al., 2023; Aydar et al., 2020).

Diversas formulações foram testadas, variando a forma de adição da biomassa (biomassa em pasta ou em pó), o tipo de base vegetal e a proporção de ingredientes complementares. As amostras com melhor desempenho sensorial foram selecionadas para o desenvolvimento posterior da aplicação alimentar.

#### 4.2.2. Análise sensorial

A avaliação sensorial da bebida vegetal com incorporação de WC foi realizada em duas fases complementares. Inicialmente, conduziu-se uma análise sensorial preliminar com 8 colaboradores da empresa Allmicroalgae, com o objetivo de validar conceitos iniciais, testar diferentes formulações e recolher sugestões espontâneas de melhoria. Após a degustação das amostras, os participantes preencheram um formulário de aceitabilidade e discutiram os ingredientes utilizados, o que permitiu ajustes na composição e definição de uma fórmula com maior potencial de aceitação.

Com base nos resultados dessa etapa e nos interesses identificados pela empresa, foi estruturado o teste de aceitabilidade final, conduzido com um painel de consumidores. A prova envolveu quatro amostras: bebida base sem *Chlorella*, bebida com biomassa standard, bebida com biomassa modificada (produzida sob diferentes condições de cultivo) e uma bebida vegetal comercial de referência. O teste foi realizado em ambiente controlado, com iluminação neutra e temperatura ambiente, e seguiu os princípios metodológicos da análise sensorial afetiva, incluindo escala hedônica de 9 pontos para avaliação de cor, aroma, sabor, textura e aceitação global.

**Tabela 2.** Correspondência entre os códigos e as amostras testadas.

<b>Código</b>	<b>Amostra</b>
<b>475</b>	Bebida vegetal comercial
<b>682</b>	Bebida com <i>Chlorella</i> atual
<b>319</b>	Bebida com <i>Chlorella</i> modificada
<b>740</b>	Bebida vegetal sem <i>Chlorella</i>

As amostras foram codificadas com números aleatórios de três dígitos e apresentadas em ordem aleatória a cada provador, garantindo o anonimato e evitando viés. Os dados

recolhidos foram utilizados para apoiar a decisão sobre a formulação mais promissora para aplicação e desenvolvimento futuro (tabela 2).

#### 4.2.3. Análises reológicas

A análise reológica das bebidas vegetais foi realizada a partir dos dados obtidos em ensaios de viscosimetria rotacional efetuados no laboratório da Universidade Católica do Porto. Os resultados experimentais, fornecidos pela equipa técnica responsável pela execução dos ensaios, foram utilizados para elaborar as curvas de “Shear stress” e “Instantaneous viscosity” em função da taxa de deformação.

Os ensaios foram realizados em quatro formulações de bebida vegetal: a amostra comercial, a bebida base sem *Chlorella*, a bebida com *Chlorella* atual e a bebida com *Chlorella* modificada. As medições foram efetuadas a uma temperatura controlada de 25 °C, utilizando uma sonda cone-plate 4/40 (ângulo de 4° e diâmetro de 40 mm). A taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ) variou entre 0,1 e 100 s<sup>-1</sup>, registando-se os valores de tensão de corte ( $\tau$ ) e viscosidade instantânea ( $\eta$ ) em cada ponto.

Para cada amostra foram realizadas três medições independentes, e os valores médios foram utilizados na análise comparativa do comportamento reológico, seguindo os procedimentos descritos por Kwok et al. (2024), modificado.

#### 4.3. Resultados e discussão

A primeira etapa da análise consistiu na comparação da composição de diferentes bebidas vegetais disponíveis no mercado, o que permitiu identificar tendências comuns nas formulações atualmente comercializadas. A tabela 3 apresenta a composição de várias bebidas vegetais comerciais, abrangendo diferentes bases (soja, arroz, coco, aveia e amêndoa). Em geral, as formulações incluem água como base principal, um ingrediente vegetal em proporções variáveis (entre 2,3 % e 12,5 %) e aditivos estabilizantes, como goma gelana, goma xantana ou goma de alfarroba, que contribuem para a estabilidade físico-química e a textura desejada do produto.

Adicionalmente, observou-se que a maioria das formulações inclui a adição de vitaminas, nomeadamente B12, D2 e B2, bem como de minerais como o cálcio, frequentemente na forma de fosfato tricálcico ou carbonato de cálcio. Esta estratégia visa compensar a ausência natural de determinados micronutrientes nas bebidas vegetais não fortificadas, especialmente em termos de teor proteico, cálcio biodisponível e vitamina B12 (Alpro, 2025; Pingo Doce, 2025).

A caracterização apresentada serviu como referência para a definição da formulação desenvolvida no presente trabalho, com incorporação de biomassa de WC numa matriz vegetal. Procurou-se atingir um perfil nutricional funcional e competitivo, recorrendo a ingredientes de origem natural, sem recorrer à fortificação artificial com vitaminas ou minerais isolados. A escolha da *Chlorella* justificou-se pela sua elevada densidade nutricional, com destaque para o conteúdo proteico, a presença de fibra e o teor natural de vitamina B12 (Allmicroalgae, 2025).

**Tabela 3.** Composição de bebidas vegetais disponíveis no mercado (2024–2025)

Composição	Base	Estabilizador	Aromas	Outros	Referência
<b>Soja</b>	Água, Grãos de soja descascados (12%)	Goma gelana	Aromas naturais	Sal marinho, vitaminas B2, B12, D.	(Pingo Doce, 2025)
<b>Arroz</b>	Base de arroz (98,4%) (água, arroz (12,5%))	Goma gelana	-	Óleo de girassol, Cálcio (fosfato tricálcico), Sal marinho, Reguladores de acidez (fosfatos de potássio), Vitaminas B12, D2	(Alpro, 2025)
<b>Coco</b>	Água, Leite de coco (5,3%) (creme de coco, água)	Goma de guar, Goma gelana, Goma xantana	Aromas naturais	Arroz (3,3%), Fosfato tricálcico, Sal marinho, Vitaminas (B12, D2)	(Alpro, 2025)
<b>Avena</b>	Água, Aveia (8,7%)	Goma gelana	-	Fibra de raiz de chicória, Óleo de girassol, Carbonato de cálcio, Sal marinho, Vitaminas (B2, B12, D2)	(Alpro, 2025)
<b>Amêndoa</b>	Água Almendra (2.3%)	Goma de alfarroba, Goma gelana	-	Cálcio, Sal marinho, Lecitina (emulsionante), Vitaminas (B2, B12, D2, E)	(Alpro, 2024)

A segunda etapa da análise consistiu na avaliação dos hábitos de consumo e percepções dos consumidores em relação às bebidas vegetais e à utilização de microalgas em alimentos e bebidas. A amostra foi composta por 50 participantes (n = 50), maioritariamente com dieta

omnívora (86 %), seguida por uma pequena proporção de indivíduos que evitam produtos lácteos (6 %) ou que se enquadram noutras categorias alimentares (8 %). Esta predominância reflete um perfil alimentar generalista, em que a escolha por bebidas vegetais não se associa necessariamente a restrições dietéticas, mas sim a fatores como a saúde digestiva, a curiosidade ou a diversificação alimentar. De facto, apenas cerca de um terço dos inquiridos relatou consumir bebidas vegetais de forma regular (diariamente ou várias vezes por semana), enquanto quase metade (48 %) indicou consumi-las raramente ou nunca, sugerindo que este tipo de produto ainda não se encontra plenamente incorporado nos hábitos alimentares da população avaliada.

No que diz respeito às preferências, observou-se uma predominância das bebidas de aveia (42 %) e amêndoa (28 %), seguidas por outras opções como coco, soja e arroz. Este padrão está em consonância com as tendências do mercado europeu, nas quais a aveia tem vindo a destacar-se pelo seu sabor neutro, perfil nutricional equilibrado e boa tolerância digestiva. Além disso, verificou-se uma preferência clara por bebidas sem adição de açúcares (48 %), o que reflete uma maior consciencialização dos consumidores quanto ao impacto do açúcar na saúde metabólica. Cerca de 60 % dos participantes afirmaram verificar sempre ou ocasionalmente os rótulos nutricionais antes da compra, indicando um nível intermédio de literacia alimentar e um crescente interesse na composição e qualidade nutricional dos produtos de origem vegetal.

Relativamente à perceção sobre o uso de microalgas em alimentos e bebidas, 54 % dos inquiridos afirmaram já ter ouvido falar de espécies como *Chlorella* e *Spirulina* (esta última, uma cianobactéria com elevado teor proteico e pigmentos bioativos). Apenas 40 % dos participantes indicaram ter consumido algum produto contendo biomassa de microalgas, mas 52 % mostraram-se dispostos a experimentar, e 58 % expressaram uma perceção positiva ou muito positiva, considerando estes ingredientes interessantes e saudáveis.

A ausência de respostas negativas sugere uma boa aceitação potencial e um elevado interesse dos consumidores por produtos inovadores de base natural. Estes resultados reforçam a pertinência da incorporação de biomassa de *Chlorella* em matrizes alimentares, tal como proposto neste trabalho, destacando o seu potencial como ingrediente funcional capaz de melhorar o valor nutricional, promover benefícios metabólicos e responder às tendências de sustentabilidade e saúde atualmente observadas no mercado alimentar. Assim, a partir destes resultados, procurou-se incorporar a biomassa de *Chlorella* (WCP) numa bebida vegetal já aceite e mais utilizada pelos consumidores.

A formulação final selecionada (bebida vegetal à base de aveia, tâmaras, avelãs, pistáchios e 3 % de WCP) revelou um perfil nutricional equilibrado e funcional. Como apresentado na figura 16, por 100 g de produto, a bebida contém 1,87 g de fibra (7 % DR), 2,21 g de proteína (4 % DR) e 1,65 µg de vitamina B12 (66 % VRN), justificando as alegações nutricionais de “fonte de fibra” (com base no critério de densidade energética, pelo menos 1,5 g de fibra por 100 kcal), “fonte de proteína” e “alto teor de vitamina B12”, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1924/2006.

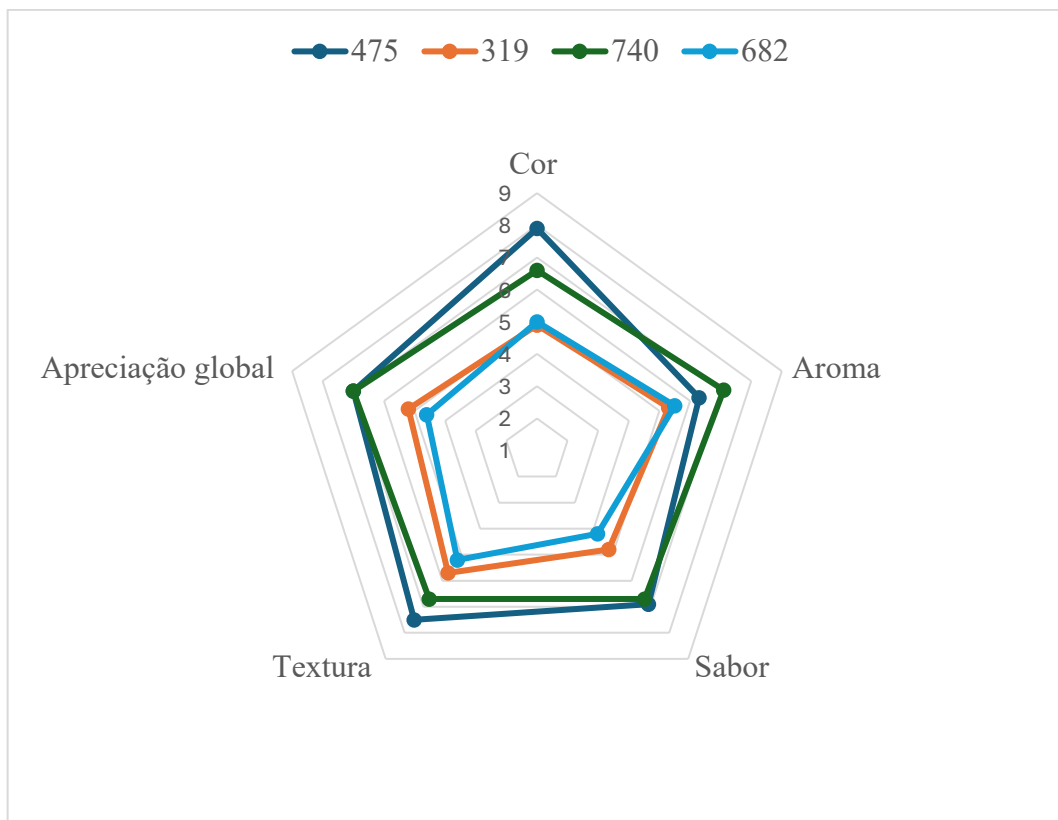
Avaliando a aceitação sensorial da bebida com *Chlorella* (amostra 682), os resultados demonstraram pontuações moderadas nos atributos analisados: aroma ( $5,52 \pm 1,99$ ), cor ( $5,00 \pm 1,84$ ), sabor ( $4,22 \pm 1,93$ ), textura ( $5,19 \pm 1,96$ ) e apreciação global ( $4,63 \pm 2,00$ ), conforme apresentado na tabela 4 e representado no gráfico radar (figura 14). Comparativamente, a amostra 475 (bebida comercial de referência) apresentou os valores mais elevados em todos os atributos, enquanto a bebida base sem *Chlorella* (amostra 740) obteve pontuações superiores às daquelas da amostra com microalga.

A avaliação sensorial das quatro formulações (740, 475, 682 e 319) revelou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na maioria dos atributos analisados, refletindo percepções distintas dos provadores quanto à cor, aroma, sabor, textura e apreciação global (tabela 4). No atributo cor, as amostras 475 e 740 apresentaram as maiores pontuações médias, enquanto 682 e 319 foram avaliadas de forma inferior. Embora as formulações com *Chlorella* branca (682 e 319) apresentem baixo teor de clorofila e, conseqüentemente, não exibam a tonalidade verde típica, a adição de 3 % da biomassa resultou em diferenças significativas em relação às bebidas sem microalga.

Este comportamento está de acordo com os resultados de colorimetria obtidos para as suspensões aquosas da biomassa (Capítulo II), nas quais se observaram variações significativas nos parâmetros  $C^*$  e  $h^\circ$  em função da concentração e da temperatura, ainda que as diferenças totais de cor ( $\Delta E_{00}$ ) se tenham mantido abaixo do limiar de percepção ( $\Delta E_{00} < 2$ ). Resultados semelhantes foram reportados por Almeida et al. (2025) e Fanari et al. (2023), que observaram que a incorporação de microalgas, mesmo em baixas concentrações, pode alterar a aparência visual de produtos alimentares.

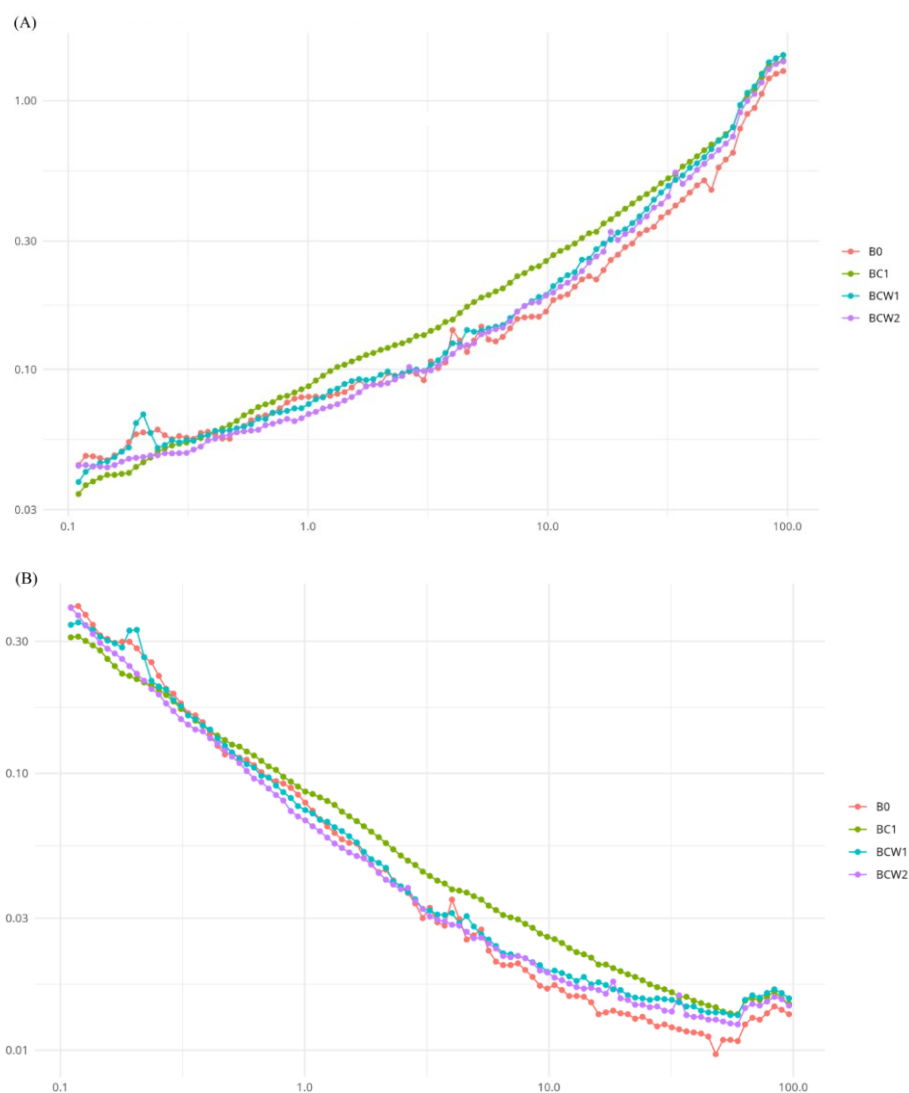
No atributo aroma, observaram-se diferenças significativas entre as formulações, com a amostra 740 a apresentar a maior aceitação, seguida da 475, enquanto as bebidas com *Chlorella* branca (319 e 682) obtiveram avaliações inferiores. Segundo Fanari et al. (2023), a introdução de microalgas em produtos alimentares está associada a notas umami, doces e ligeiramente herbáceas, influenciadas pela presença de aminoácidos como a alanina, responsável pela

percepção de sabor doce. Em baixas concentrações, essas características podem contribuir positivamente para o aroma global, mas, em níveis mais elevados, tendem a modificar o perfil sensorial esperado.



**Figura 14.** Comparação do perfil de aceitação sensorial das amostras 319, 475, 682 e 740 nos atributos cor, aroma, sabor, textura e apreciação global.

Em relação ao sabor, as amostras 740 e 475 obtiveram as maiores pontuações, sendo descritas como mais agradáveis, enquanto as bebidas com *Chlorella* branca (319 e 682) apresentaram valores significativamente inferiores. A menor aceitação destas formulações pode estar associada às características sensoriais próprias da biomassa, que conferem notas ligeiramente amargas ou herbáceas à matriz vegetal. Resultados semelhantes foram reportados por Almeida et al. (2025), que observaram melhor aceitação em formulações com 1,5 % de *Chlorella* Honey™ em comparação com 4,0 %, confirmando que concentrações mais elevadas de microalgas tendem a reduzir a aceitação sensorial global.



**Figura 15.** Curvas reológicas das bebidas vegetais base, comerciais e com *Chlorella* branca. (A) “Shear stress” (Pa) vs “shear rate” (1/s). (B) “Instantaneous viscosity” (Pa.s) vs “shear rate” (1/s).

Os resultados obtidos para a textura e a apreciação global confirmam as diferenças observadas nos restantes atributos sensoriais. A amostra 475 apresentou a melhor avaliação de textura, sendo estatisticamente semelhante à 740, enquanto as formulações com *Chlorella* branca (319 e 682) foram classificadas de forma significativamente inferior. As curvas reológicas (figura 15) evidenciaram comportamento pseudoplástico em todas as formulações, caracterizado pela redução da viscosidade aparente com o aumento da taxa de corte; padrão típico de sistemas alimentares com partículas em suspensão.

A incorporação da biomassa microalgal (amostras BCW1 e BCW2) resultou num ligeiro aumento do esforço de corte e da viscosidade em comparação com as bebidas sem *Chlorella* (B0 e BC1), sugerindo maior resistência ao fluxo e, conseqüentemente, uma sensação de boca

mais espessa ou pastosa, o que pode ter contribuído para as pontuações sensoriais mais baixas. Segundo Viegas et al. (2025), alterações nas propriedades reológicas influenciam diretamente a percepção de textura, podendo afetar a fluidez e a suavidade percebidas.

No atributo de apreciação global, observou-se que as bebidas sem adição de *Chlorella* (475 e 740) apresentaram as pontuações médias mais elevadas, sem diferenças estatísticas entre si, o que indica que a formulação base desenvolvida neste estudo apresenta um perfil sensorial comparável ao da bebida comercial. Este resultado sugere que a matriz vegetal utilizada não foi um fator limitante na aceitação, confirmando a sua adequação como base para o enriquecimento funcional. Em contrapartida, a incorporação de WC, tanto na 682 como 319, provocou uma redução significativa da apreciação global, evidenciando que, apesar da ausência de clorofila e do impacto visual reduzido, a adição da biomassa influenciou negativamente a percepção sensorial global. Este efeito pode estar associado à combinação de alterações subtis na cor, no sabor e na textura, tal como reportado em estudos prévios sobre a integração de microalgas em matrizes alimentares (Almeida et al., 2025; Fanari et al., 2023; Viegas et al., 2025).

**Tabela 4.** Médias ( $\pm$  desvio padrão) dos atributos sensoriais das amostras de produto, com letras de significância (a, b, ab) indicando diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).




Atributo	740	475	682	319
<b>Cor</b>	6.56 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup>	7.93 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	5.00 $\pm$ 1.84 <sup>b</sup>	4.85 $\pm$ 1.94 <sup>b</sup>
<b>Aroma</b>	7.15 $\pm$ 1.54 <sup>b</sup>	6.33 $\pm$ 1.27 <sup>ab</sup>	5.52 $\pm$ 1.99 <sup>a</sup>	5.26 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>
<b>Sabor</b>	6.74 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	6.85 $\pm$ 2.33 <sup>a</sup>	4.22 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	4.78 $\pm$ 2.21 <sup>b</sup>
<b>Textura</b>	6.70 $\pm$ 1.61 <sup>ab</sup>	7.52 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	5.19 $\pm$ 1.96 <sup>b</sup>	5.74 $\pm$ 1.72 <sup>b</sup>
<b>Apreciação global</b>	6.96 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	7.04 $\pm$ 1.97 <sup>a</sup>	4.63 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>	5.22 $\pm$ 2.04 <sup>b</sup>

(A)

Declaração nutricional	Por 100 g	%DR* / % VRN**
<b>Energia</b>	671 kJ / 71	4%
<b>Lípidos, dos quais:</b>	2,35 g	3%
das quais saturadas	0,30 g	1%
<b>Hidratos de carbono</b>	8,95 g	3%
dos quais açúcares	4,70 g	5%
<b>Fibra</b>	1,87 g	7%
<b>Proteínas</b>	2,21 g	4%
<b>Sal</b>	0,03 g	1%
<b>Vitamina B12</b>	1,65 µg	66%

\*DR: Dose de Referência de um adulto médio (8400 kJ / 2000 kcal).  
 \*\*VRN: Valor de Referência do Nutriente (Regulamento (UE) n.º 1169/2011).  
 ND: Não Detectado.



- (C)
-  Fonte de fibras
  -  Fonte de proteína
  -  Alto teor de vitamina B12

**Figura 16.** Composição nutricional (A), embalagem do produto (B) e alegações nutricionais (C) da bebida vegetal à base de aveia, tâmaras, avelãs, pistáchios e 3 % de *Chlorella* branca (WCP).

## 5. Considerações finais

### 5.1. Conclusões

O presente trabalho, desenvolvido no âmbito do estágio curricular realizado na empresa Allmicroalgae – Natural Products S.A., permitiu avaliar de forma integrada o potencial tecnológico e alimentar da biomassa de *Chlorella* branca (White *Chlorella* Allma®), uma microalga heterotrófica despigmentada com características sensoriais mais favoráveis para aplicação em alimentos.

Na Parte I, o estudo das condições de cultivo revelou que a variação do rácio C/N influenciou significativamente a composição da biomassa em pequena escala, promovendo o aumento do teor de amido em C/N 6 e a redução do teor proteico em C/N 24. Contudo, estes efeitos não foram reproduzidos no fermentador de 5 L, onde os valores obtidos se aproximaram dos do controlo.

Na Parte II, a caracterização das propriedades tecno-funcionais demonstrou diferenças marcantes entre a biomassa húmida (WCF) e a biomassa seca (WCP). A WCF apresentou maior solubilidade e valores superiores de pH, enquanto a secagem reduziu a fração solúvel, provavelmente devido a alterações estruturais das proteínas. A estabilidade das emulsões aumentou com a concentração e com o tratamento térmico, atingindo valores máximos a 121 °C, especialmente para a WCP. As análises mostraram ainda que a biomassa modificada (WCPM) exibiu melhor desempenho emulsificante e maior resistência térmica, sugerindo que ajustes no cultivo e no processamento podem melhorar a funcionalidade e ampliar as suas aplicações tecnológicas. Por outro lado, nenhuma das biomassas apresentou capacidade gelificante até 20 % (m/v), embora possam atuar como agentes espessantes ou estabilizantes.

Na Parte III, a incorporação de 3 % de WCP numa bebida vegetal à base de aveia permitiu avaliar a aplicabilidade sensorial da *Chlorella* branca em matrizes alimentares. A bebida desenvolvida apresentou um perfil nutricional valorizado, destacando-se como fonte de fibra, fonte de proteína e com alto teor natural de vitamina B12. No entanto, os resultados sensoriais mostraram que a adição de biomassa (tanto na versão atual (682) como na modificada (319)) reduziu significativamente a aceitação global quando comparada com a bebida base (740) e com a bebida comercial de referência (475).

Este decréscimo esteve associado a alterações subtis na cor, sabor e textura, indicando que, apesar da ausência de clorofila e do impacto visual reduzido, a microalga ainda influencia a

percepção gustativa e a sensação de boca. Importa salientar que a bebida base formulada neste trabalho apresentou desempenho sensorial semelhante ao da bebida comercial, demonstrando que a matriz utilizada é adequada e que o principal fator limitante para a aceitação foi a incorporação da biomassa microalgal.

Em conjunto, os resultados obtidos confirmam o elevado potencial nutricional e funcional da *Chlorella* branca, mas também evidenciam desafios sensoriais relevantes que ainda precisam de ser superados para viabilizar a sua aplicação em alimentos de grande consumo.

## 5.2. Perspetivas Futuras

Para investigações futuras, será essencial aprofundar o estudo das condições de cultivo que permitam controlar de forma reprodutível a composição da biomassa, nomeadamente voltando a testar, em fermentação, os rácios C/N avaliados em pequena escala, de modo a ultrapassar a discrepância observada no fermentador de 5 L e possibilitar a obtenção de biomassas com teores mais elevados de amido ou proteína consoante o objetivo pretendido.

A compreensão e estabilização destes perfis composicionais são fundamentais para otimizar o desempenho tecno-funcional da *Chlorella* branca, particularmente no que diz respeito à solubilidade, estabilidade de emulsão e comportamento reológico. No contexto da aplicação alimentar, seria pertinente explorar estratégias de processamento que reduzam o impacto sensorial da biomassa (mantendo a vantagem da sua baixa pigmentação) e testar diferentes níveis de incorporação, matrizes vegetais e técnicas de mascaramento, de forma a melhorar a aceitação global sem comprometer o valor nutricional. Estas abordagens poderão consolidar o uso da *Chlorella* branca como ingrediente funcional em produtos de base vegetal, ampliando a sua aplicabilidade industrial.

## 6. Referências bibliográficas

- All products* | *Alpro*. (n.d.). Retrieved November 1, 2025, from <https://www.alpro.com/pt/produtos?category=bebidas>
- Allmicroalgae. (2025). *Product Specifications* | *Especificações de Produto White Chlorella Powder Product Information* | *Informação do Produto*.
- Almeida, J., Bettencourt, A. F., Lopes, S., Paiva, J., Leal, C., Santos, M. T., Cardoso, H., Almeida, C., & Ribeiro, I. A. C. (2025). Exploring *Chlorella* honey for the improvement of energy boost hydrogels. *Algal Research*, *92*, 104352. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2025.104352>
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, *2*(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2013.01.004>
- Bebida Vegetal de Soja sem Açúcar Pingo Doce* | *Pingo Doce*. (n.d.). Retrieved November 1, 2025, from <https://www.pingodoce.pt/home/produtos/leite-natas-e-ovos/bebida-vegetal/bebida-vegetal-de-soja-sem-acucar-pingo-doce-953941.html?>
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods* *2017*, *Vol. 6*, *Page 33*, *6*(5), 33. <https://doi.org/10.3390/FOODS6050033>
- Cai, Y., Zhai, L., Fang, X., Wu, K., Liu, Y., Cui, X., Wang, Y., Yu, Z., Ruan, R., Liu, T., & Zhang, Q. (2022). Effects of C/N ratio on the growth and protein accumulation of heterotrophic *Chlorella* in broken rice hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13068-022-02204-Z/TABLES/3>
- Chen, B., Gong, R., Qiao, Z., Men, J., Tan, L., Tian, S., & Jin, H. (2025). Improving *Chlorella* protein production under heterotrophic high cell density fed-batch cultivation with a two-stage nitrogen nutrient supply strategy. *Green Carbon*, *3*(2), 208–217. <https://doi.org/10.1016/J.GREENCA.2024.10.002>
- Chi, C., Zhou, Y., Cheng, F., Guo, X., Chen, B., Zhang, Y., & He, Y. (2023). *Chlorella* sp. MBFJNU-17 as an emerging source of starch: Changes in starch structures during heterotrophic cultivation. *Industrial Crops and Products*, *204*, 117345. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2023.117345>
- Cruz, J. D., & Vasconcelos, V. (2023). Legal Aspects of Microalgae in the European Food Sector. *Foods*, *13*(1), 124. <https://doi.org/10.3390/FOODS13010124>
- Cultivating Sustainable Microalgae Solutions – Allmicroalgae*. (n.d.). Retrieved October 5, 2025, from <https://www.allmicroalgae.com/en/>
- Espinosa-Ramírez, J., Mondragón-Portocarrero, A. C., Rodríguez, J. A., Lorenzo, J. M., & Santos, E. M. (2023). Algae as a potential source of protein meat alternatives. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1254300. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2023.1254300>
- Falcão, R. L., Pinheiro, V., Ribeiro, C., Sousa, I., Raymundo, A., & Nunes, M. C. (2023). Nutritional Improvement of Fresh Cheese with Microalga *Chlorella vulgaris*: Impact

- on Composition, Structure and Sensory Acceptance. *Food Technology and Biotechnology*, 61(2), 259–270. <https://doi.org/10.17113/FTB.61.02.23.7851>
- Fanari, F., Comaposada, J., Boukid, F., Climent, E., Claret Coma, A., Guerrero, L., & Castellari, M. (2023). Enhancing energy bars with microalgae: A study on nutritional, physicochemical and sensory properties. *Journal of Functional Foods*, 109, 105768. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2023.105768>
- Ferreira de Oliveira, A. P., & Bragotto, A. P. A. (2022). Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*, 6, 100157. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2022.100157>
- Garcia, E. S., Van Leeuwen, J. J. A., Safi, C., Sijtsma, L., Van Den Broek, L. A. M., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & Van Den Berg, C. (2018). Techno-Functional Properties of Crude Extracts from the Green Microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(29), 7831–7838. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B01884>
- García-Encinas, J. P., Ruiz-Cruz, S., Juárez, J., Ornelas-Paz, J. de J., Del Toro-Sánchez, C. L., & Márquez-Ríos, E. (2025). Proteins from Microalgae: Nutritional, Functional and Bioactive Properties. *Foods* 2025, Vol. 14, Page 921, 14(6), 921. <https://doi.org/10.3390/FOODS14060921>
- Georgiou, D., Charisis, A., Theocharidou, A., Ritzoulis, C., Papapanagiotou, G., Samara, C., Chatzidoukas, C., & Kalogianni, E. P. (2024). Foaming Properties of *Chlorella sorokiniana* Microalgal Biomass. *Colloids and Interfaces*, 8(6), 66. <https://doi.org/10.3390/COLLOIDS8060066/S1>
- Gouda, M., Tadda, M. A., Zhao, Y., Farmanullah, F., Chu, B., Li, X., & He, Y. (2022). Microalgae Bioactive Carbohydrates as a Novel Sustainable and Eco-Friendly Source of Prebiotics: Emerging Health Functionality and Recent Technologies for Extraction and Detection. *Frontiers in Nutrition*, 9, 806692. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.806692/FULL>
- Grossmann, L., Ebert, S., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2018). Production of protein-rich extracts from disrupted microalgae cells: Impact of solvent treatment and lyophilization. *Algal Research*, 36, 67–76. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.09.011>
- Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019). Solubility of extracted proteins from *Chlorella sorokiniana*, *Phaeodactylum tricornutum*, and *Nannochloropsis oceanica*: Impact of pH-value. *LWT*, 105, 408–416. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.01.040>
- Guo, X., Wang, Q., Wu, Y., Liu, X., & Gong, Z. (2024). Comprehensive insights into microalgae proteins: Nutritional profiles and innovative applications as sustainable alternative proteins in health and food sciences. *Food Hydrocolloids*, 154, 110112. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2024.110112>
- Hernández, H., Nunes, M. C., Prista, C., & Raymundo, A. (2022). Innovative and Healthier Dairy Products through the Addition of Microalgae: A Review. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 755, 11(5), 755. <https://doi.org/10.3390/FOODS11050755>

- Hosseinzand, H., Sokhansanj, S., & Lim, C. J. (2018). Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Drying Technology*, 36(9), 1049–1060. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1369986>;CTYPE:STRING:JOURNAL
- Li, T., Gargouri, M., Feng, J., Park, J. J., Gao, D., Miao, C., Dong, T., Gang, D. R., & Chen, S. (2015). Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 180, 250–257. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.01.005>
- McClements, D. J. (2021). Food hydrocolloids: Application as functional ingredients to control lipid digestion and bioavailability. *Food Hydrocolloids*, 111, 106404. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.106404>
- Mendes, M. C., Navalho, S., Ferreira, A., Paulino, C., Figueiredo, D., Silva, D., Gao, F., Gama, F., Bombo, G., Jacinto, R., Aveiro, S. S., Schulze, P. S. C., Gonçalves, A. T., Pereira, H., Gouveia, L., Patarra, R. F., Abreu, M. H., Silva, J. L., Navalho, J., ... Speranza, L. G. (2022). Algae as Food in Europe: An Overview of Species Diversity and Their Application†. *Foods*, 11(13), 1871. <https://doi.org/10.3390/FOODS11131871/S1>
- Mosibo, O. K., Ferrentino, G., & Udenigwe, C. C. (2024). Microalgae Proteins as Sustainable Ingredients in Novel Foods: Recent Developments and Challenges. *Foods 2024, Vol. 13, Page 733, 13(5)*, 733. <https://doi.org/10.3390/FOODS13050733>
- Naik, B., Mishra, R., Kumar, V., Mishra, S., Gupta, U., Rustagi, S., Gupta, A. K., Preet, M. S., Bhatt, S. C., & Rizwanuddin, S. (2024). Micro-algae: Revolutionizing food production for a healthy and sustainable future. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15, 100939. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2023.100939>
- Nath, P. C., Debnath, S., Sridhar, K., Inbaraj, B. S., Nayak, P. K., & Sharma, M. (2022). A Comprehensive Review of Food Hydrogels: Principles, Formation Mechanisms, Microstructure, and Its Applications. *Gels 2023, Vol. 9, Page 1, 9(1)*, 1. <https://doi.org/10.3390/GELS9010001>
- Noticias Allmicroalgae - Microalgas de nueva imagen: Un futuro brillante para las de color claro.* (n.d.). Retrieved October 5, 2025, from <https://www.allmicroalgae.com/en/2021/03/25/new-look-microalgae-bright-future-for-light-coloured-chlorella/>
- Nunes, E., Odenthal, K., Nunes, N., Fernandes, T., Fernandes, I. A., & Pinheiro de Carvalho, M. A. A. (2024). Protein extracts from microalgae and cyanobacteria biomass. Techno-functional properties and bioactivity: A review. *Algal Research*, 82, 103638. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2024.103638>
- Pandiselvam, R., Mitharwal, S., Rani, P., Shanker, M. A., Kumar, A., Aslam, R., Barut, Y. T., Kothakota, A., Rustagi, S., Bhati, D., Siddiqui, S. A., Siddiqui, M. W., Ramniwas, S., Aliyeva, A., & Mousavi Khaneghah, A. (2023). The influence of non-thermal technologies on color pigments of food materials: An updated review. *Current Research in Food Science*, 6, 100529. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2023.100529>

- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2012). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology* 2012 6:1, 6(1), 36–60. <https://doi.org/10.1007/S11947-012-0867-9>
- Pereira, T., Barroso, S., Pinto, F. R., Silva, F., Teixeira, P., Mendes, S., & Gil, M. M. (2024). Application of microalgae as natural colorant for pastry and confectionary products. *Food Science and Nutrition*, 12(11), 9479–9492. <https://doi.org/10.1002/FSN3.4394;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.08.037>
- Pinchart, P. E., Marter, P., Brinkmann, H., Quilichini, Y., Mysara, M., Petersen, J., Pasqualini, V., & Mastroleo, F. (2024). The genus *Limnospira* contains only two species, both unable to produce microcystins: *L. maxima* and *L. platensis*. *IScience*, 27(9), 110845. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2024.110845>
- Polewski, K., Wei, Z., Terpou, A., Dahiya, D., & Nigam, P. S. (2025). Prospects of Gels for Food Applications from Marine Sources: Exploring Microalgae. *Gels* 2025, Vol. 11, Page 569, 11(8), 569. <https://doi.org/10.3390/GELS11080569>
- Prates, J. A. M. (2025). Unlocking the Functional and Nutritional Potential of Microalgae Proteins in Food Systems: A Narrative Review. *Foods* 2025, Vol. 14, Page 1524, 14(9), 1524. <https://doi.org/10.3390/FOODS14091524>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.04.007>
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 587. <https://doi.org/10.1007/S13197-010-0162-6>
- Schüler, L., Greque de Moraes, E., Trovão, M., Machado, A., Carvalho, B., Carneiro, M., Maia, I., Soares, M., Duarte, P., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., & Varela, J. (2020). Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants With Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 541876. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00469/BIBTEX>
- Su, M., Bastiaens, L., Verspreet, J., & Hayes, M. (2023). Applications of Microalgae in Foods, Pharma and Feeds and Their Use as Fertilizers and Biostimulants: Legislation and Regulatory Aspects for Consideration. *Foods* 2023, Vol. 12, Page 3878, 12(20), 3878. <https://doi.org/10.3390/FOODS12203878>
- Takeshita, T., Ota, S., Yamazaki, T., Hirata, A., Zachleder, V., & Kawano, S. (2014). Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresource Technology*, 158, 127–134. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.01.135>

- Thakur, A., Sharma, D., Saini, R., Suhag, R., & Thakur, D. (2024). Cultivating blue food proteins: Innovating next-generation ingredients from macro and microalgae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *60*, 103278. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2024.103278>
- Trovão, M., Barros, A., Machado, A., Reis, A., Pedroso, H., Espírito Santo, G., Correia, N., Costa, M., Ferreira, S., Cardoso, H., Varela, J., Silva, J., Pereira, H., & Freitas, F. (2025). Heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* yellow mutant on sidestreams: Medium formulation and process scale-up. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *13*(2), 115361. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2025.115361>
- Trovão, M., Cardoso, L., Schüler, L., Machado, A., Santo, G. E., Pedroso, H., Reis, A., Barros, A., Correia, N., Costa, M., Ferreira, S., Cardoso, H., Mateus, M., Silva, J., Pereira, H., Freitas, F., & Varela, J. (2024). Oxyfluorfen: a novel metabolic inhibitor to select microalgal chlorophyll-deficient mutant strains for nutritional applications. *Algal Research*, *81*, 103572. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2024.103572>
- Trovão, M., Schüler, L. M., Machado, A., Bombo, G., Navalho, S., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., Freitas, F., & Varela, J. (2022). Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. *Marine Drugs*, *20*(7), 440. <https://doi.org/10.3390/MD20070440/S1>
- Ursu, A. V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, *157*, 134–139. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.01.071>
- Van De Walle, S., Gifuni, I., Coleman, B., Baune, M. C., Rodrigues, A., Cardoso, H., Fanari, F., Muylaert, K., & Van Royen, G. (2024). Innovative vs classical methods for drying heterotrophic *Chlorella vulgaris*: Impact on protein quality and sensory properties. *Food Research International*, *182*, 114142. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2024.114142>
- Van De Walle, S., Muylaert, K., & Van Royen, G. (2025). Influence of cell disruption on techno-functional properties and digestibility of *Chlorella vulgaris* proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *102*, 104023. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2025.104023>
- Viegas, Â., Raio, M., Alegria, M. J., & Raymundo, A. (2025). Upcycling apple and pear pulp into functional smoothies: A sustainable approach using microalgae and antioxidant enhancement. *Food Bioscience*, *71*, 107241. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2025.107241>
- Vonlanthen, S., Dauvillée, D., & Purton, S. (2015). Evaluation of novel starch-deficient mutants of *Chlorella sorokiniana* for hyper-accumulation of lipids. *Algal Research*, *12*, 109. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.08.008>
- Wang, C. A., Onyeaka, H., Miri, T., & Soltani, F. (2024). *Chlorella vulgaris* as a food substitute: Applications and benefits in the food industry. *Journal of Food Science*, *89*(12), 8231. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17529>

- Wijesekara, T., & Xu, B. (2024). A critical review on the stability of natural food pigments and stabilization techniques. *Food Research International*, *179*, 114011. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2024.114011>
- Xiao, X., Zhou, Y., Liang, Z., Lin, R., Zheng, M., Chen, B., & He, Y. (2022). A novel two-stage heterotrophic cultivation for starch-to-protein switch to efficiently enhance protein content of *Chlorella sp.* MBFJNU-17. *Bioresource Technology*, *344*, 126187. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126187>
- Yang, S., Xu, H., Chen, J. H., Liu, B., & Cheng, K. W. (2024). Microalgae as a Sustainable Protein Source: Key Issues Related to Their Production, Application, and the Way Forward. *Food and Bioprocess Technology*, *17*(8), 1–33. <https://doi.org/10.1007/S11947-023-03194-Y/METRICS>
- Zhang, Z., Cai, W., Ma, R., Ho, S. H., Xie, Y., & Chen, J. (2025). Two-stage trophic strategy coupled with fed-batch operation for simultaneous enhancement of cell growth and lutein synthesis in *Chlorella sorokiniana*. *Biochemical Engineering Journal*, *215*, 109632. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2025.109632>
- Zheng, J., Geng, J., Li, J., Li, D., Yang, S., Lu, X., Liu, J., Zhang, C., & Sun, H. (2025). Harnessing microalgae for protein production: advances, functional properties, and industrial potential. *Future Foods*, *12*, 100776. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2025.100776>
- Zheng, X., Chen, L., Yin, L., Rao, H., Zheng, H., Xun, C., & Hao, J. (2024). Application and prospect of microbial food *Chlorella*. *Heliyon*, *10*(18), e37025. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37025>

## 7. Apêndices

### 7.1. Apêndice I

**Tabela 5.** Valores C\* da biomassa em pó de *Chlorella* branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias), sob diferentes temperaturas (Ambiente, 85 °C e 121 °C) e concentrações (2 %, 5 % e 10 %).

Temp.	Métricas por dia			
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
2				
121C	14.29 <sup>a</sup> ± 0.23	14.18 <sup>a</sup> ± 0.14	12.90 <sup>b</sup> ± 0.32	13.17 <sup>b</sup> ± 0.10
85C	14.24 <sup>a</sup> ± 0.13	13.56 <sup>b</sup> ± 0.23	13.03 <sup>c</sup> ± 0.23	12.58 <sup>c</sup> ± 0.14
Amb	13.16 <sup>a</sup> ± 0.71	12.37 <sup>ab</sup> ± 0.67	11.89 <sup>ab</sup> ± 0.27	11.44 <sup>b</sup> ± 0.33
5				
121C	20.14 <sup>b</sup> ± 0.13	20.83 <sup>a</sup> ± 0.16	20.29 <sup>b</sup> ± 0.02	20.38 <sup>b</sup> ± 0.02
85C	20.03 <sup>a</sup> ± 0.22	19.86 <sup>ab</sup> ± 0.14	19.52 <sup>bc</sup> ± 0.10	19.34 <sup>c</sup> ± 0.06
Amb	20.18 <sup>a</sup> ± 0.47	19.78 <sup>a</sup> ± 0.17	19.52 <sup>a</sup> ± 0.07	19.96 <sup>a</sup> ± 0.02
10				
121C	22.75 <sup>b</sup> ± 0.08	23.29 <sup>a</sup> ± 0.25	22.22 <sup>c</sup> ± 0.13	22.54 <sup>bc</sup> ± 0.09
85C	21.52 <sup>a</sup> ± 0.14	21.59 <sup>a</sup> ± 0.12	21.42 <sup>a</sup> ± 0.11	21.57 <sup>a</sup> ± 0.02
Amb	22.14 <sup>a</sup> ± 0.15	21.90 <sup>ab</sup> ± 0.10	21.61 <sup>b</sup> ± 0.08	21.86 <sup>ab</sup> ± 0.18

**Tabela 6.** Valores do ângulo de matiz (h°) da biomassa em pó de *Chlorella* branca (WCP) durante o armazenamento (0–3 dias) sob diferentes temperaturas (Ambiente, 85 °C e 121 °C) e concentrações (2 %, 5 % e 10 %).

Temp.	Métricas por dia			
	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3
2				
121C	99.28 <sup>b</sup> ± 0.45	99.61 <sup>b</sup> ± 0.62	101.57 <sup>a</sup> ± 0.22	101.42 <sup>a</sup> ± 0.04
85C	101.45 <sup>b</sup> ± 0.26	101.77 <sup>b</sup> ± 0.27	102.78 <sup>a</sup> ± 0.21	103.19 <sup>a</sup> ± 0.22
Amb	106.13 <sup>a</sup> ± 1.87	106.35 <sup>a</sup> ± 1.23	103.61 <sup>a</sup> ± 0.16	103.81 <sup>a</sup> ± 0.17
5				
121C	91.52 <sup>b</sup> ± 0.08	92.22 <sup>a</sup> ± 0.38	92.17 <sup>a</sup> ± 0.06	92.31 <sup>a</sup> ± 0.09
85C	93.71 <sup>a</sup> ± 0.23	94.15 <sup>a</sup> ± 1.06	94.04 <sup>a</sup> ± 0.66	94.70 <sup>a</sup> ± 0.26
Amb	96.33 <sup>a</sup> ± 0.55	95.76 <sup>ab</sup> ± 0.74	94.52 <sup>bc</sup> ± 0.19	94.14 <sup>c</sup> ± 0.11
10				
121C	88.21 <sup>b</sup> ± 0.58	87.88 <sup>b</sup> ± 0.31	89.29 <sup>a</sup> ± 0.10	89.32 <sup>a</sup> ± 0.05
85C	91.92 <sup>a</sup> ± 0.86	91.45 <sup>a</sup> ± 1.20	92.49 <sup>a</sup> ± 0.16	92.53 <sup>a</sup> ± 0.07
Amb	93.60 <sup>a</sup> ± 0.12	92.70 <sup>bc</sup> ± 0.53	93.01 <sup>ab</sup> ± 0.01	92.09 <sup>c</sup> ± 0.24

## 7.2. Apêndice II

### **Questionário do Consumidor – Caracterização dos Provedores**

Este questionário é anónimo e destina-se exclusivamente à caracterização geral dos participantes para fins de análise dos resultados do teste sensorial.

1. Idade: \_\_\_\_\_ anos

2. Género:

Feminino

Masculino

Outro

Prefiro não dizer

3. Dieta alimentar habitual: (assinale apenas uma opção)

Vegana (não consome produtos de origem animal)

Vegetariana (não consome carne, mas consome laticínios ou ovos)

Evita produtos lácteos (ex.: intolerância à lactose, alergia ou escolha pessoal)

Omnívora (consome todos os tipos de alimentos)

Outra: \_\_\_\_\_

4. Com que frequência consome bebidas vegetais?

Todos os dias

Várias vezes por semana

Cerca de uma vez por semana

Menos de uma vez por semana

Raramente

Nunca

5. Quais os tipos de bebidas vegetais que consome com mais frequência? (pode assinalar mais de uma)

Aveia

Soja

Arroz

Amêndoa

Coko

Outra(s): \_\_\_\_\_

6. Quando compra bebidas vegetais, qual a sua preferência em relação ao teor de açúcar?

Com açúcar (tradicional)

0% açúcar (sem adição de açúcar nem adoçantes)

Com adoçantes (naturais ou artificiais)

Indiferente

Nunca reparei

7. Costuma verificar os ingredientes e os benefícios nutricionais nas embalagens antes de comprar uma bebida vegetal?

Sim, sempre

Sim, às vezes

Raramente

Nunca

8. Qual o intervalo de preço que considera aceitável pagar por uma bebida vegetal de 1 litro?

Menos de 1,50 €

Entre 1,50 € e 2,00 €

Entre 2,01 € e 2,50 €

Entre 2,51 € e 3,00 €

Mais de 3,00 €

Outro: \_\_\_\_\_

9. Qual o principal motivo pelo qual consome bebidas vegetais?

Questões de saúde (intolerância, alergia, digestão, etc.)

Estilo de vida (veganismo, vegetarianismo, evitar laticínios)

Preferência de sabor

Questões ambientais ou éticas

Outro: \_\_\_\_\_

10. Já ouviu falar de microalgas utilizadas em alimentos ou bebidas?  
(ex.: *Chlorella*, *Spirulina*, entre outras)

- Sim
- Não
- Outro: \_\_\_\_\_

11. Já consumiu algum alimento ou bebida com microalgas?

- Sim, com frequência
- Sim, uma ou poucas vezes
- Não, mas estaria disposto(a) a experimentar
- Não, e não tenho interesse em consumir
- Outro: \_\_\_\_\_

12. Como classificaria a sua percepção geral sobre o uso de microalgas em alimentos ou bebidas?

- Muito positiva – considero interessante e saudável
- Positiva – não me incomoda, pode ter benefícios
- Neutra – não tenho opinião formada
- Negativa – tenho reservas quanto ao sabor ou aspeto
- Muito negativa – evito produtos com microalgas

### 7.3. Apêndice III

#### Ficha de análise sensorial – Bebida vegetal com *Chlorella*

**Código da amostra:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinale com um X a classificação que acha mais adequada para cada atributo.

- | <b>Cor</b>   | <b>Aroma</b>   | <b>Sabor</b>   |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 9= Gosto extremamente</li><li>• 8= Gosto muito</li><li>• 7=Gosto</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• 9= Gosto extremamente</li><li>• 8= Gosto muito</li><li>• 7=Gosto</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• 9= Gosto extremamente</li><li>• 8= Gosto muito</li><li>• 7=Gosto</li></ul> |

- 6=Gosto ligeiramente
- 5=Não gosto nem desgosto
- 4=Desgosto ligeiramente
- 3=Desgosto
- 2=Desgosto muito
- 1=Desgosto extremamente

- 6=Gosto ligeiramente
- 5=Não gosto nem desgosto
- 4=Desgosto ligeiramente
- 3=Desgosto
- 2=Desgosto muito
- 1=Desgosto extremamente

- 6=Gosto ligeiramente
- 5=Não gosto nem desgosto
- 4=Desgosto ligeiramente
- 3=Desgosto
- 2=Desgosto muito
- 1=Desgosto extremamente

### **Textura**

- 9= Gosto extremamente
- 8= Gosto muito
- 7=Gosto
- 6=Gosto ligeiramente
- 5=Não gosto nem desgosto
- 4=Desgosto ligeiramente
- 3=Desgosto
- 2=Desgosto muito
- 1=Desgosto extremamente

### **Apreciação global**

- 9= Gosto extremamente
- 8= Gosto muito
- 7=Gosto
- 6=Gosto ligeiramente
- 5=Não gosto nem desgosto
- 4=Desgosto ligeiramente
- 3=Desgosto
- 2=Desgosto muito
- 1=Desgosto extremamente