

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**LUANA DE CARVALHO**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA COMBINADA DE NISINA E EXTRATOS DE  
*Spirulina platensis* CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E  
GRAM-NEGATIVAS**

**MEDIANEIRA  
2023**

LUANA DE CARVALHO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA COMBINADA DE NISINA E EXTRATOS DE  
*Spirulina platensis* CONTRA BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E  
GRAM-NEGATIVAS**

**Combined antimicrobial action of nisin and *Spirulina platensis*  
extracts against Gram-positive and Gram-negative bacteria**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Eliane Colla.

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto Maia.

MEDIANEIRA  
2023



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Medianeira**



LUANA DE CARVALHO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA COMBINADA DE NISINA E EXTRATOS DE SPIRULINA PLATENSIS CONTRA BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 25 de Abril de 2023

Dra. Eliane Colla, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Flavio Dias Ferreira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Jane Martha Graton Mikcha, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 25/04/2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade concedida, por ter me sustentado durante todo esse período e pelo seu amor e cuidado, me sustentando e dando forças para que eu concluísse esse trabalho.

À minha mãe Antonia, por não medir esforços, em meio às dificuldades e se manter firme para mais essa conquista. Essa conquista também é sua!

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Colla, por ter aceito a orientação, pela paciência, pela compreensão nos momentos difíceis, por todo conhecimento no qual me foi passado e pela dedicação para a conclusão do trabalho.

Agradeço a minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Luciana Furlaneto Maia, por ter me recebido e me acolhido em Londrina e em seu laboratório (LAMBDA) com tanto carinho, pela paciência, por todo conhecimento transmitido, pela disponibilidade e compreensão nos momentos difíceis, por ter sido incansável em todo processo de análise experimental para que o trabalho fosse concluído com sucesso.

A todos os professores da UTFPR, pelos conhecimentos transmitidos e por toda dedicação com seus alunos, vocês têm um diferencial. Gostaria de agradecer em especial a Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Cristiane Canan por não medir esforços em me ajudar todas as vezes que precisei.

Agradeço aos meus colegas de turma em especial a Ianamara Santorum, pela amizade, convivência durante todo esse período, pela ajuda e parceria durante as disciplinas.

Agradeço ao Laboratório Multiusuários da UTFPR-Câmpus Londrina (LabMult-LD) e as técnicas e estagiários pela disponibilidade, ajuda e paciência durante as análises.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcia Cristina Furlaneto da UEL, por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório (Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos), pela disponibilidade, pela oportunidade de aprendizado e por disponibilizar seus equipamentos para realização das análises experimentais.

Agradeço a todas as doutorandas do laboratório pela ajuda com as análises e por terem me recebido tão bem. Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 – e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

## RESUMO

Nos últimos anos, os consumidores de alimentos têm buscado por alimentos microbiologicamente seguros, porém com reduzida concentração de aditivos sintéticos. Neste sentido, tem emergido o uso de substâncias antimicrobianas de origem natural. Outra tendência é a utilização de dois ou mais compostos antimicrobianos, que apresentem ação sinérgica, no controle de patógenos de veiculação alimentar. Neste sentido a microalga *Spirulina platensis* tem sido reconhecida pela presença de compostos com propriedades antimicrobianas. Peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) também tem sido uma tendência no controle de patógenos alimentares. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação sinérgica de extratos de *S. platensis* e nisina de uso comercial na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-). Foram realizados quatro protocolos de extração de compostos de *S. platensis*, seguido do teste de disco difusão para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, tendo sido testadas um total de 24 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Foi selecionada a extração alcóolica-ácido fórmico-sonicação por apresentar atividade antimicrobiana contra 91% das cepas testadas, com tamanhos de halo variando de 10 a 30 mm no teste de disco difusão. A partir destes resultados, foram selecionadas as bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. O teste de disco difusão também foi realizado com nisina BV® na concentração de 12,5 mg/mL. Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e o teste de *checkerboard* foram realizados. Os valores de CIM para a nisina isolada variaram de 0,5 a 0,12 µg/mL e para o extrato variaram de 0,5 a 0,06µg/mL. Quando ambos compostos foram combinados, os valores foram de 0,12 a 0,0078 µg/mL. Os valores de ICIF foram de 0,302 a 0,18 representando sinergismo entre os compostos. A Curva de crescimento microbiano com as substâncias combinadas nos intervalos de 0, 2, 6, 12 e 24 horas, mostrou eficiência na redução microbiana quando os compostos foram utilizados na forma combinada. Testes de Citometria de Fluxo e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizados para confirmar a lesão das bactérias testadas na presença dos compostos antimicrobianos combinados; a Citometria de Fluxo foi realizada com o extrato de *S. platensis* separadamente e o MEV foi realizado a partir dos compostos separados e o combinado das duas substâncias. Na análise por Citometria de Fluxo utilizando Iodeto de propídio foi observado um deslocamento do pico de intensidade do fluoróforo, indicando aumento da permeabilidade da membrana bacteriana. *L. monocytogenes* tratada com extrato de *S. platensis* e nisina combinadas apresentaram características de extravasamento de material intracelular, sugerindo o rompimento de membrana celular, quando observado ao MEV. Estes resultados sugerem que a combinação de *S. platensis* e nisina tem potencial para aplicação na indústria alimentícia como alternativa para os conservantes sintéticos, uma vez que ambas as substâncias têm *status* GRAS (geralmente reconhecido como seguro) e apresentaram ação antimicrobiana sinérgica contra patógenos importantes veiculados por alimentos, potencializando seus efeitos.

**Palavras-chave:** *Arthrospira platensis*; bacteriocina; conservante natural; sinergismo antimicrobiano.

## ABSTRACT

In recent years, food consumers have been looking for microbiologically safe foods, but with a reduced concentration of synthetic additives. In this sense, the use of antimicrobial substances of natural origin has emerged. Another trend is the use of two or more antimicrobial compounds, which present synergistic action, in the control of foodborne pathogens. In this sense, the microalgae *Spirulina platensis* has been recognized for its high amount of phenolic compounds, which have antimicrobial properties. Antimicrobial peptides (bacteriocins) have also been trending in the control of foodborne pathogens. Therefore, the objective of this work was to evaluate the synergistic action of extracts of *S. platensis* and commercially used nisin in inhibiting the growth of Gram-positive (+) and Gram-negative (-) bacteria. Four extraction protocols of *S. platensis* compounds were performed, followed by the disc diffusion test for Gram-positive and Gram-negative bacteria, with a total of 24 Gram-positive and Gram-negative bacteria tested. Alcoholic acid-formic acid-sonication extraction was selected because of its antimicrobial activity against 91% of the strains tested, with halo sizes ranging from 10 to 30 mm in the disk diffusion test. From these results, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* bacteria were selected. The disk diffusion test was also performed with nisin BV® at a concentration of 12.5 mg/mL. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assays and the checkerboard test were performed. MIC values for isolated nisin ranged from 0.5 to 0.12 µg/mL and for the extract ranged from 0.5 to 0.06 µg/mL. When both compounds were combined, the values ranged from 0.12 to 0.0078 µg/mL. ICIF values ranged from 0.302 to 0.18 representing synergism between compounds. The microbial growth curve with the substances combined in the intervals of 0, 2, 6, 12 and 24 hours, showed efficiency in the microbial reduction when the compounds were used in the combined form. Flow Cytometry and Scanning Electron Microscopy (SEM) tests were performed to confirm the injury of the bacteria tested in the presence of combined antimicrobial compounds, Flow Cytometry was performed with the *S. platensis* extract separately and the SEM was performed from of the separate compounds and the combination of the two substances. In the Flow Cytometry analysis using propidium iodide, a displacement of the peak intensity of the fluorophore was observed, indicating an increase in the permeability of the bacterial membrane. In the observation carried out with SEM, extravasation of intracellular material was observed, suggesting the disruption of the cell membrane, especially when treated with *S. platensis* and nisin combined. These results suggest that the combination of *S. platensis* and nisin has potential for application in the food industry as an alternative to synthetic preservatives, since both substances have GRAS status (generally recognized as safe) and have shown antimicrobial action against important pathogens transmitted by foods, with synergy between them, enhancing their effects.

**Key-words:** *Arthrospira platensis*; bacteriocin; natural preservative; antimicrobial synergism.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microalga <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> .....	16
<b>Figura 2.</b> Estratégia experimental .....	29
<b>Figura 3.</b> Técnica de disco difusão dos extratos de <i>Spirulina platensis</i> , sendo A (extração alcoólica, B (ultra-som-centrifugação), C banho-álcool-acetona), D (alcóolica-ácido fórmico-sonicação), e N (nisina), destacando o halo de inibição formado (seta).....	36
<b>Figura 4.</b> Efeito do tratamento de <i>Listeria monocytogenes</i> ; em (A) células controle, sem tratamento; (B) células tratadas com nisina; (C) células tratadas com extrato de <i>S. platensis</i> ; (D) células tratadas com nisina e extrato de <i>Spirulina platensis</i> ; seta: massa amorfa; aumento 30.000x. ....	46



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição média da biomassa de <i>Spirulina platensis</i> .....	17
<b>Tabela 2.</b> Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações .....	33
<b>Tabela 3.</b> Valores de halos de inibição de bactérias Gram-positivas com extratos de <i>S. platensis e nisina</i> .....	37
<b>Tabela 4.</b> Valores de halos de inibição de bactérias Gram-negativas com extratos de <i>S. platensis e nisina</i> .....	38
<b>Tabela 5.</b> Valores de concentração inibitória fracionada (CIF) da nisina com extrato de <i>S. platensis</i> em combinação contra células planctônicas de bactérias de origem alimentar.....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Curvas de crescimento da nisina e extrato de *S. platensis*, separadamente e em combinação sobre a bactéria *Escherichia coli*. As suspensões microbianas sem agentes antimicrobianos foram utilizadas como grupo controle..42
- Gráfico 2.** Curvas de crescimento da nisina e extrato de *S. platensis*. separadamente e em combinação de sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* . As suspensões microbianas sem agentes antimicrobianos foram utilizadas como grupo controle.....42
- Gráfico 3.** Curvas de crescimento da nisina e extrato de *S. platensis*. separadamente e em combinação sobre a bactéria *Listeria monocytogenes*. As suspensões microbianas sem agentes antimicrobianos foram utilizadas como grupo controle.....43
- Gráfico 4:** Gráficos de intensidade de fluorescência de células de *Escherichia coli* coradas com IP; (A) células controle, sem tratamento com antimicrobianos; (B) células tratadas com extrato de *Spirulina platensis*; (C) células tratadas com nisina ..... 44
- Gráfico 5:** Gráficos de intensidade de fluorescência de células de *Listeria monocytogenes* coradas com IP; (A) células controle, sem tratamento com antimicrobianos; (B) células tratadas com extrato de *Spirulina platensis*; (C) células tratadas com nisina.....44
- Gráfico 6:** Gráficos de intensidade de fluorescência de células de *Staphylococcus aureus* coradas com IP; (A) células controle, sem tratamento com antimicrobianos; (B) células tratadas com extrato de *Spirulina platensis*; (C) células tratadas com nisina ..... 45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 <i>Spirulina platensis</i></b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Atividade Antimicrobiana da <i>S. platensis</i></b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Bactérias Potencialmente Patogênicas em Alimentos</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>20</b>
<b>3.3.2 <i>Salmonella</i> sp</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.3 <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	<b>22</b>
<b>3.4 Nisina</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5 Conservantes na Indústria de Alimentos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.6 Sinergismo entre Conservantes Naturais</b> .....	<b>26</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Microrganismos e Origem da nisina e da Biomassa de <i>S. platensis</i></b> .....	<b>28</b>
<b>4.2 Estratégia Experimental</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3 Extração dos Compostos Bioativos de <i>S. platensis</i></b> .....	<b>30</b>
<b>4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>S. platensis</i> e nisina pela técnica de Disco Difusão</b> .....	<b>31</b>
<b>4.5 Espectro Inibitório da nisina e dos Extratos da <i>Spirulina platensis</i></b> .....	<b>31</b>
<b>4.6 Avaliação do efeito sinérgico entre nisina e extrato de <i>Spirulina</i></b> .....	<b>32</b>
<b>4.7 Curva de crescimento microbiano</b> .....	<b>34</b>
<b>4.8 Citometria de Fluxo para determinação de células mortas pelos compostos nisina e extrato de <i>Spirulina</i></b> .....	<b>34</b>
<b>4.9 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>34</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1 Espectro Inibitório da nisina e Extratos de <i>S. platensis</i></b> .....	<b>36</b>
<b>5.2 Espectro Inibitório e Teste de <i>Checkerboard</i></b> .....	<b>40</b>
<b>5.3 Citometria de Fluxo e Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>43</b>

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação do consumidor com a inocuidade e segurança dos alimentos vem incentivando a indústria alimentícia a buscar novas alternativas e tecnologias capazes de assegurar a qualidade e segurança de alimentos. Anualmente, cerca de 2 bilhões de indivíduos são afetados de forma direta e indireta com doenças relacionadas a alimentos, que ocorrem devido a contaminação alimentar de origem microbiológica (ALSHUNIABER; KRISHNAMOORTHY; ALQHTANI, 2020). Por consequência, se torna necessário o controle destes microrganismos patogênicos causadores de intoxicações e/ou infecções, que geralmente envolvem agentes como *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* (ALSHUNIABER; KRISHNAMOORTHY; ALQHTANI, 2020).

Os métodos tradicionalmente utilizados para o controle do crescimento de microrganismos em alimentos visando sua conservação, acréscimo da vida útil e prevenção de doenças de origem alimentar envolvem a aplicação de aditivos e conservantes sintéticos, associados ao controle da temperatura. No entanto, a aplicação de aditivos naturais que resultem no aumento da fase *lag* é uma nova alternativa ao controle microbiológico de patógenos e deteriorantes (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Neste contexto, surgiram os produtos *Clean Label*, para o qual uma das vertentes envolve a substituição de aditivos sintéticos por produtos de origem natural (MARUYAMA; STRELETSKAYA; LIM, 2021; ASIOLI et al., 2017).

O conceito *Clean Label* tem se mostrado como fator importante por uma parcela do público consumidor na escolha de produtos alimentícios, que buscam por alimentos nos quais os conservantes e outros aditivos sejam de origem natural. Isso trouxe consigo novos desafios às indústrias de processamento alimentar, sendo necessário o uso de novas tecnologias ou a combinação de tecnologias direcionadas a necessidade atual de substituir os conservantes artificiais por naturais, reaproveitar subprodutos com potencial aplicação alimentar buscando menor desperdício de matéria prima, que sejam seguros ao consumo e atendam aos requisitos de qualidade (MISRA et al., 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

Alguns dos aditivos naturais estudados incluem componentes proveniente de animais, plantas e microrganismos que são utilizados como agentes de defesa nos

organismos que os sintetizam, como as lacperoxidases no leite, as lisozimas no ovo branco, saponinas e flavonóides nas ervas, quitosanas no camarão, e bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, como a nisina. Também tem recebido atenção os compostos bioativos extraídos de biomassas de microalgas, como a *Spirulina platensis*, devido ao fato de possuírem ação antimicrobiana e antioxidante, além de poderem ser utilizados como fonte de pigmentos naturais, com forte tendência de aplicação na indústria de alimentos (MISRA et al., 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

*Spirulina platensis* ou *Arthrospira platensis* é uma microalga pertencente a classe das cianobactérias, considerada um organismo multicelular fotossintético com altos índices proteicos e diversos benefícios comprovados à saúde do consumidor, incluindo atividade antimicrobiana (MISRA et al., 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis*, com ação antimicrobiana bem estabelecida e muito utilizada na indústria de produtos lácteos (MISRA et al., 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

Considerando os aspectos abordados, neste trabalho buscou-se avaliar a ação de extratos de *S. platensis* e da bacteriocina nisina frente a microrganismos patogênicos comumente detectados como contaminantes em alimentos, além de avaliar a sinergia dos dois compostos citados frente ao crescimento microbiano.

Convém destacar que nos últimos anos muitos artigos científicos avaliaram o efeito antimicrobiano da *S. platensis* em matrizes alimentares, porém não há relatos científicos sobre o sinergismo entre compostos dessa microalga com bacteriocinas (MISRA et al., 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015). Assim, a temática deste trabalho apresenta-se como uma premissa científica atual e poderá contribuir com a indústria de alimentos na pesquisa de conservantes naturais que atendam a tendência mundial de diminuição da aplicação de aditivos químicos em alimentos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar a ação antagonística de nisina e compostos extraídos de *S. platensis* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, potencialmente patogênicas em alimentos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar a extração de compostos antimicrobianos da biomassa de *S. platensis* por quatro métodos: extração alcoólica, ultrassom, banho-álcool-acetona e alcóolica-ácido fórmico-sonicação;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos extraídos contra 24 cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas para a seleção do extrato com maior potencial antimicrobiano e das cepas mais afetadas;
- Avaliar a ação sinérgica do extrato de *S. platensis* selecionado associado a nisina contra as bactérias selecionadas;
- Avaliar a curva de crescimento bacteriano com extrato de *S. platensis* associado a nisina;
- Realizar citometria de Fluxo para verificar a ação da *S. platensis* na membrana plasmática das bactérias testes;
- Verificar as alterações da parede bacteriana causada pelo extrato e nisina através da microscopia eletrônica de varredura.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Spirulina platensis*

A utilização da *Spirulina* sp. na alimentação teve início na pré-história. O cultivo da *Spirulina* sp. começou no Lago Texcoco, no México, pelos povos astecas, e no Lago Chade, na África, pela tribo Kanembu, que retiravam a alga do lago, secavam e utilizavam-na para a confecção de bolos e pães (AMBROSI et al., 2008; COLLA et al., 2007; SANCHÉZ et al., 2003; BELAY, 2002).

*S. platensis*, também conhecida como *Atrhospira* é uma microalga pertencente a classe das cianobactérias, multicelular, filamentosa e fotossintética caracterizada por sua estrutura cilíndrica em forma de espiral não ramificável de coloração verde/azulada (Figura 1) (VONSHAK, 1997; BECKER, 2007; ÇELEKLI; YAVUZATMACA; BOZKURT, 2009; KORU, 2012).

**Figura 1 - Microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis*.**



**Fonte: MICROALGAE (2021)**

Trata-se de uma microalga citada pela primeira vez pelo algologista francês Dangeard, que na década de 40 publicou um relatório sobre um bolo de algas verdes chamado de *dihé*, pertencente ao povo Kanembu, localizado próximo ao Lago Chade no centro do continente Africano. As algas eram secas ao sol antes de seu consumo, e, posteriormente, estas algas foram identificadas como *S. platensis* (HENRIKSON, 2009).

*S. platensis* é considerada uma das principais tendências na indústria de



alimentos por possuir altas concentrações de nutrientes, superando diversas plantas, grãos e ervas utilizadas atualmente, além de conter entre 46 a 74% de proteínas de elevada digestibilidade (BHINGARDE; NIMSE, 2022). Além disso, sua composição também inclui vitamina E, vitaminas do complexo B,  $\beta$ -caroteno, ferro, astaxantina, ficobiliproteína, ficocianina, clorofila, ácidos graxos poli-insaturados (principalmente  $\omega$ -6) e diversos aminoácidos essenciais, como leucina, valina e isoleucina. Em matéria seca, cerca de 8~14% são carboidratos e 4~9% são lipídios (BECKER, 2007; GOUVEIA et al., 2010; LUM; KIM; LEI, 2013; YAAKOB et al., 2014; DEMORAIS et al., 2015; VAZ et al., 2016; MENEGOTTO et al., 2019, LAFARGA, 2019). Na Tabela 1 apresenta-se a composição nutricional média da *S. platensis* na sua apresentação em pó.

**Tabela 1 - Composição média da biomassa de *S. platensis***

Composição	g/100 g	Composição	mg/100 g
Água	4,68	Vitamina C	10,1
Proteína	57,5	Vitamina B6	0,364
Carboidratos	23,9	Tiamina	2,38
Fibra	3,6	Riboflavina	3,67
Cálcio	0,120	Niacina	12,8
Ferro	0,028	Vitamina E	5,0
Magnésio	0,195	Vitamina K	0,02
Fósforo	0,118	$\beta$ -caroteno	0,342
Potássio	1,36	Isoleucina	3210
Lipídios totais	7,72	Valina	3510
18:1n-9 <sup>a</sup>	0,347	Leucina	4950
18:2n-6 <sup>b</sup>	1,25	Arginina	4150
18:3n-3 <sup>c</sup>	0,823	Alanina	4520

**Legenda.** <sup>a</sup>Ácido oleico; <sup>b</sup>Ácido linoléico; <sup>c</sup>Ácido linolênico.

**Fonte:** Adaptado de FDC - Food Data Central (2018).

A agência de fiscalização americana *Food and Drug Administration* (FDA), responsável por garantir a segurança alimentar e a saúde pública do consumidor, classifica a *S. platensis* na categoria Generally Recognized as Safe (GRAS), portanto, podendo ser utilizada como ingrediente e/ou alimento pela indústria alimentícia, de forma segura (LAFARGA, 2019).

Esta microalga apresenta propriedades nutricionais e funcionais como estímulo ao sistema imunológico (AMBROSI et al., 2008), efeito protetor contra diabetes e obesidade (ANITHA et al., 2010) e controle de dislipidemias (NARMADHA et al., 2012), além de inibição da replicação viral (AMBROSI et al., 2008); apresenta também, efeitos anticarcinogênico (CARREIRA et al., 2018). Com isso, a microalga se torna uma excelente matéria-prima com composição apropriada para uma alimentação saudável, sendo utilizada também para enriquecer nutricionalmente alimentos como biscoitos (BATISTA et al., 2017; SILVA; VALLE; PERRONE, 2021), barras de cereais (LUCAS et al., 2019), massas (FRADINHO et al., 2020; GRAHL et al., 2020; ZEN et al., 2020), bebidas lácteas (OLIVEIRA et al., 2021), sorvetes (TIEPO et al., 2021; FARESIN et al., 2022) e iogurtes (SILVA et al., 2019). Porém, existem desafios na sua utilização, como a redução na qualidade sensorial, devido a coloração verde e o sabor e aroma desagradáveis relatados pelo consumidor (SILVA; VALLE; PERRONE, 2021).

### **3.2 Atividade Antimicrobiana da *S. platensis***

*Spirulina* sp. é uma das microalgas comercialmente utilizadas como suplemento alimentar (SIMPORE et al., 2006; GOUVEIA et al., 2010; SILVA et al., 2022; MATOS et al., 2017). Além das proteínas convencionais, a *S. platensis* também contém percentuais de ficobiliproteínas, que são pigmentos coloridos que funcionam como receptor de luz para a fotossíntese, sendo a estrutura constituída por cromóforos ligados a resíduos de cisteína de uma apoenzima; as ficobiliproteínas de microalgas são classificadas em três grupos: ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004). Diversos estudos têm atribuído o potencial antioxidante e antimicrobiano da *S. platensis* à ficocianina (DENG e CHOW, 2010; GOUDA et al., 2015; SILVA et al., 2019). Outros autores por sua vez, indicam que a atividade antimicrobiana pode ser justificada pela presença de ácidos graxos como o  $\gamma$ -linolênico (ELSHEEKH et al., 2014).

A atividade antimicrobiana de *S. platensis* pode ser atribuída a diferentes compostos como o ácido gama-linolênico, ácidos graxos, efeito sinérgico de ácido láurico e palmitoleico (YAMAGUCHI et al., 1998; DEFOIRDT, 2007). As substâncias antimicrobianas extraídas da biomassa algal são mais efetivas para a inibição de bactérias Gram-positivas, o que pode ser atribuído ao fato de que a parede celular em

bactérias Gram-positivas consiste em uma única camada, enquanto a parede celular de bactérias Gram-negativas, consiste em uma estrutura de multicamadas delimitada por uma membrana celular externa (DENG et al., 2012) e/ou devido à barreira de permeabilidade fornecida pela parede celular ou ao mecanismo de acumulação de membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE; ARUOMA, 1987).

Diversos solventes como metanol, diclorometano, éter de petróleo e acetato de etila têm sido usados para extrair os compostos bioativos da *S. platensis* (OZDEMIR, 2018). Neste sentido, alguns autores indicam que a atividade antibacteriana dos compostos extraídos pode ser mascarada pela presença de compostos inibidores nos extratos, sendo importante, portanto, eliminar os solventes utilizados nos processos de extração, realizando a completa evaporação através do ponto de ebulição correto e secagem total do solvente (MARCOCCI; PACKER; DROY-LEFAIX, 1994).

### 3.3 Bactérias Potencialmente Patogênicas em Alimentos

As doenças transmitidas por alimentos ocorrem quando um patógeno é ingerido com alimentos e se estabelece (e geralmente se multiplica) no hospedeiro humano, ou quando um patógeno toxigênico se estabelece em um produto alimentar e produz uma toxina, que é então ingerida pelo hospedeiro humano. Assim, as doenças transmitidas por alimentos são geralmente classificadas em: (a) infecção alimentar e (b) intoxicação alimentar (BINTSIS, 2017).

Dentre os patógenos alimentares, se destacam as bactérias que causam um grande número de doenças com efeitos significativos sobre a saúde humana e a economia, sendo as espécies mais prevalentes: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Cronobacter sakazakii*, sorotipos de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* sp. e *Yersinia enterocolitica* (BINTSIS, 2017).

A maioria das bactérias patogênicas são mesófilas, com temperatura ótima de crescimento variando de 20 °C a 45 °C. No entanto, certos patógenos transmitidos por alimentos como *Listeria monocytogenes* e *Y. enterocolitica* são capazes de crescer sob condições de refrigeração ou temperaturas inferiores a 10 °C (psicrófilos) (BINTSIS, 2017).

A conscientização sobre o impacto na saúde pública de patógenos transmitidos por alimentos tem crescido e o surgimento de novos patógenos e a forma de

transmissão está mudando ou está associada a novos veículos alimentares. Ainda, a resistência antimicrobiana dos patógenos transmitidos por alimentos é um problema emergente de saúde pública (AKBAR E KUMAR-ANAL, 2011).

Práticas inadequadas de manipulação e saneamento de alimentos, sistemas regulatórios fracos, falta de educação para manipuladores de alimentos e mudança no perfil do consumidor, impactando na redução de aditivos químicos, são as principais razões para a ocorrência comum de doenças transmitidas por alimentos em diversos países (AKBAR E KUMAR-ANAL, 2011).

### 3.3.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos imóveis que aparecem sozinhos ou em pares, tétrades, cadeias curtas ou aglomerados característicos “semelhantes a uvas”. Os estafilococos são anaeróbios facultativos, com exceção de *Staphylococcus saccharolyticus* e *S. aureus*, que crescem mais rapidamente em condições aeróbias (BACON, 2003). *S. aureus* pode sobreviver por longos períodos em locais secos, e isolado do ar, poeira, esgoto e água, tornando-o um dos patógenos mais resistentes não formadores de esporos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION FDA, 2012).

A distribuição do *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas, como as de poeira (BANNERMAN, 2003). Tem grande importância quando encontrado nos alimentos, sendo considerado um microrganismo indicador e também um importante patógeno, que leva a um quadro de intoxicação alimentar devido à ingestão de toxinas pré - produzidas no alimento. Sua presença indica que houve falhas nos cuidados de manipulação, pois o mesmo é encontrado normalmente na microbiota da pele, nasofaringe e fossa nasal do seres humanos. Para que isto não ocorra, é importante que o alimento sofra uma rápida refrigeração, limitando a multiplicação do agente e consequente produção de toxinas (SALES et al., 2013).

### 3.3.2 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* é pertencente à família Enterobacteriaceae, agrupa bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e mesófilos. São termossensíveis, sendo eliminados em temperatura maior ou igual a 65 °C. Na maioria das vezes, esses microrganismos possuem flagelos, o que lhes possibilita mobilidade. Seu pH ótimo para crescimento é 7,0, não sendo capaz de resistir a um pH menor do que 4,0 e maior do que 9,0 (FRANCO; LANDGRAF, 2002; GERMANO; GERMANO, 2015). O gênero *Salmonella* apresenta divisão em duas espécies, a *Salmonella enterica* com 2610 sorotipos e a *S. bongori* com 23 sorotipos. A espécie *S. enterica* possui seis subespécies, e dentre elas, a de maior importância é a subespécie *enterica*, por possuir sorotipos patogênicos, como o Typhi e o Paratyphi (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2017; BRASIL, 2020). Os sorotipos são identificados pelo esquema *Kauffmann-White*, baseado em diferenças em relação aos antígenos de superfície, localizados na membrana lipopolissacarídica (GRIMONT; WEILL, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; BRASIL, 2020).

Bactérias do gênero *Salmonella* apresentam a capacidade de aderir as superfícies como teflon, aço, vidro e fórmica, formando uma camada de mucopolissacarídeo denominada biofilme. Desta forma, falhas na higienização de equipamentos e utensílios podem ser responsáveis pela contaminação de alimentos por este microrganismo, bem como o contato com matéria de origem fecal (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010; SILVA et al., 2017).

Conforme as normas brasileiras vigentes (BRASIL, 2019), *Salmonella* spp. deve estar ausente em qualquer tipo de alimento, já que a maioria dos sorovares desse gênero é patogênico ao homem (FORSYTHE, 2013). No Brasil, a metodologia analítica para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos e água é definida pela Instrução Normativa (IN) nº 60 de 23 de dezembro de 2019 que preconiza o método microbiológico convencional como padrão para diagnóstico (BRASIL, 2019). Já a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 331 de 23 de dezembro de 2019 cita os padrões necessários em um determinado alimento para este ser considerado próprio ao consumo.

### 3.3.3 *Escherichia coli*

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo não formador de esporos. Pode ou não ser móvel; alguns bastonetes são flagelados e outros não (MITSCHERLICH, 1984). É um microrganismo comensal, presente no intestino de mamíferos e aves. Crescem em temperaturas de 18~44 °C sendo 37 °C a temperatura ótima de crescimento (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

*E. coli* compreende um grande e diversificado grupo de bactérias. É um microrganismo anaeróbio facultativo e fermenta açúcares simples, como glicose, para formar ácido láctico, acético e fórmico; o pH ótimo para o crescimento é 6,0 a 8,0; no entanto, o crescimento pode ocorrer tão baixo quanto pH 4,3 e tão alto quanto 9,0 a 10,0 (MITSCHERLICH, 1984). A maioria das cepas de *E. coli* são inofensivas; outras cepas adquiriram características, como a produção de toxinas, que as tornam patogênicas humanas (GARCIA, 2010). *E. coli* patogênica foi categorizada em seis grupos de acordo com o mecanismo de ação patogênica e de maior preocupação para a saúde pública: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (CROXEN, 2013).

### 3.3.4 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporo, anaeróbio facultativo. Células jovens, quando observadas ao microscópio, apresentam-se na forma lisa, assemelhando-se a pequenos difteróides, medindo de 1,0 a 2,0 µm por 0,5 µm. Após três a cinco dias de incubação, no entanto, apresentam-se como bacilos longos, medindo de 6 a 20 µ. *L. monocytogenes* é móvel devido a flagelos, apresentando movimento característico denominado tombamento, que auxilia na sua identificação. Este microrganismo apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase (FRANCO & LANDGRAF, 2022).

Listeriose é uma infecção grave geralmente causada pela ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*. Embora seja uma doença relativamente rara, tem alta taxa de mortalidade (20~30%) que a torna uma das ameaças alimentares mais mortais (JEMMI, 2006). Há descrito sete espécies que

constituem o gênero: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murray*. As espécies *L. innocua*, *L. welshimerie* *L. seeligeri* são consideradas avirulentas. Com exceção de *L. grayi* e *L. murray*, todas as espécies são contaminantes de alimentos. *L. monocytogenes* tem grande importância como patógeno para o homem e animais (TRABULSI, 1999).

Embora o pH ótimo para o crescimento desta bactéria esteja entre 6,0 e 8,0, ela pode crescer em uma faixa maior, entre 5,0 e 9,0. Em meios de cultura, no entanto, já se verificou seu crescimento em pH 9,5. Ambientes com pH inferior a 4,5 e superior a 9,5 são considerados hostis a *L. monocytogenes* (FRANCO & LANDGRAF, 2022).

Estima-se que *L. monocytogenes* cause em média 1.591 episódios de doenças transmitidas por alimentos, 1.455 hospitalizações e 255 mortes anualmente no mundo (SCALLAN, 2011).

*L. monocytogenes* é inativada por pasteurização e cozimento; no entanto, em alguns produtos prontos para consumo a contaminação dos alimentos pode ocorrer após o cozimento na fábrica, porém antes da embalagem. Estes alimentos apresentam maior risco de listeriose, pois são ingeridos sem nenhum processamento adicional, como cozimento, que causa a morte da bactéria. Muitos desses alimentos usam refrigeração, entre outros métodos, para restringir o crescimento bacteriano durante sua vida de prateleira (RAHEEM, 2016).

Ainda, Raheem (2016) descreve que, embora essas práticas padrão funcionem bem para a maioria das bactérias, elas não são adequadas para o controle da *Listeria*, pois o organismo é capaz de crescer sob temperaturas de refrigeração e muitas vezes é tolerante à temperatura de congelamento, alto teor de sal e baixo pH.

### 3.4 Nisina

A nisina é um polipeptídeo catiônico, hidrofóbico e estável ao calor. A molécula de nisina apresenta peso molecular de 3.510 Da, mas este peptídeo é capaz de formar dímeros (7.000 Da, mais estável) e tetrâmeros (14 000 Da). Vários tipos de nisina foram identificados sendo descritos as principais variantes denominadas de A, Z e Q. Desde o ano de 1951, é considerada uma substância segura (GRAS) pela agência FDA, em parte por sua importante atividade antimicrobiana e também pelo impacto mínimo causado as propriedades sensoriais dos alimentos (MELO et al., 2005).

A nisina tem atividade antimicrobiana direcionada principalmente contra

bactérias Gram-positivas e em particular as formadoras de esporos. A nisina é capaz de inibir tanto as formas vegetativas quanto o crescimento de seus esporos (MELO et al., 2005).

Estudos sugerem que a nisina tem capacidade de inibir a germinação de *Bacillus* e esporos de *Clostridium* (HURST, 1981; VENEMA et al., 1995). Além disso, a nisina também pode inibir algumas bactérias não formadoras de esporos, como *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus* e *Micrococcus* e atuam inibindo algumas bactérias Gram-negativas. Também deve ser destacado que a nisina não tem ação inibitória contra células de levedura, fungos filamentosos, vírus e bactérias Gram-negativas (GHARSALLAOUI et al., 2015).

O mecanismo de ação da nisina foi amplamente estudado e consiste na adsorção na superfície da célula-alvo e desestabilização da estrutura da membrana citoplasmática (GHARSALLAOUI et al., 2015).

Essa adsorção envolve interações eletrostáticas entre a nisina com uma carga líquida positiva e os fosfolípidos de membrana carregados negativamente (MCAULIFFE et al., 2001). Essas interações também se devem ao caráter hidrofílico da extremidade C-terminal do polipeptídeo. A hidrofobicidade da extremidade N-terminal da nisina atua subsequente para permitir a inserção da nisina na membrana celular lipídica levando à sua permeabilização. A eficácia dessa integração depende da natureza e conteúdo dos fosfolípidos da membrana celular que pode explicar as diferenças de sensibilidade entre as cepas bacterianas alvo. A liberação dos componentes do citoplasma e/ou lise celular, resulta na morte da bactéria (MCAULIFFE et al., 2001).

A quantidade de nisina usada depende de muitos fatores como a composição da matriz alimentar, intensidade na qual o tratamento térmico é aplicado, a embalagem utilizada, o pH, tempo de armazenamento antes do consumo e as condições de armazenamento, podendo ser adicionada a alimentos ácidos, permanecendo estável até uma faixa de pH 8 (MCAULIFFE et al., 2001).

A nisina é utilizada para a conservação de leite pasteurizado, queijos envelhecidos e sopas e vegetais enlatados. Em alimentos enlatados, a nisina é utilizada além dos tratamentos de pasteurização térmica para combater com sucesso os esporos resistentes ao calor de bactérias termofílicas acidófilas. Quando utilizada, deve-se ter cuidado com a presença de certos compostos químicos que podem alterar sua atividade biológica. Foi confirmado que o dióxido de titânio e o metabissulfito de



sódio degradam a nisina e inibem sua atividade pela oxidação de pontes dissulfeto. Além disso, a atividade antibacteriana da nisina é mais potente em meio líquido do que em meio sólido (DELVES-BROUGHTON, 2005).

### 3.5 Conservantes na Indústria de Alimentos

Grande parte dos alimentos, principalmente os de origem animal, possuem características intrínsecas favoráveis à sobrevivência e multiplicação de microrganismos patogênicos. Estes levam a diminuição da qualidade e da segurança do produto, expondo o consumidor ao risco de adquirir enfermidades (ELSHAFEI, 2018).

Os conservantes são aditivos que previnem ou inibem o crescimento microbiano e evitam alterações químicas indesejáveis, preservando a qualidade dos produtos e elevando seu tempo de vida prateleira. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite o uso de diferentes conservantes em alimentos processados (RODRIGUES, 2019).

Dentre os principais conservantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos estão: ácido sórbico e seus derivados, o ácido benzóico e seus sais, o ácido propiônico e seus sais, o dióxido de enxofre e seus derivados, nitrato e nitrito, o ácido acético e acetatos, o ácido p-hidroxibenzoico e seus ésteres (parabenos), o ácido láctico e seus sais e sulfitos (FANI, 2015).

As cepas de *Salmonella* spp. são sensíveis a concentrações de sal superiores a 9% e inibidas pelo uso de nitrato/nitrito e ácido sórbico (TADESSE et al. 2019), porém vale ressaltar que o uso de aditivos químicos sintéticos pode favorecer o surgimento de enfermidades na população (CONTE, 2016).

Os conservantes podem ser considerados, geralmente, substâncias estranhas ao nosso organismo, podendo ser potencialmente tóxicas se consumidos de forma inadequada. O uso de conservantes em alimentos é permitido após a confirmação da necessidade de uso e estabelecimento de níveis seguros, visto que tais aditivos estão diretamente relacionados ao surgimento de doenças oncológicas e crônicas como a hipertensão e o diabetes, ou mesmo agudas, como no caso de alergias e hiperatividade (CONTE, 2016).

Desta forma, observa-se a crescente demanda por produtos com redução ou mesmo exclusão de aditivos sintéticos em sua composição, gerando novos desafios

para as indústrias de alimentos no conceito de alimentos *Clean Label*, os quais possuem o “rótulo limpo”, por não possuírem ingredientes prejudiciais à saúde do consumidor, como os conservantes e aditivos sintéticos (LIMA, 2013).

A utilização de aditivos naturais vem ganhando cada vez mais espaço no mercado, agregando valor ao produto final; a indústria de alimentos tem grande interesse em compostos naturais para o controle da multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes em seus produtos, estes são chamados de bio-conservantes (SAELIM et al., 2017).

Os bio-conservantes podem ter origem microbiana, vegetal ou animal e apresentam como função, a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, constituindo assim, uma nova forma de garantir a qualidade e segurança do produto. Tais compostos têm a capacidade de interagir com moléculas-alvo interferindo nas funções das células microbianas (BARROS et al., 2020).

Vale destacar que a escolha de um bio-conservante deve se fundamentar principalmente na compatibilidade química e sensorial deste com determinado tipo de alimento. Alguns desses compostos naturais, como as bacteriocinas e os extratos vegetais, são promissoras neste quesito (SAELIM et al., 2017).

### **3.6 Sinergismo entre Conservantes Naturais**

O sinergismo é definido através da ação conjunta entre dois ou mais compostos distintos que, atuam de forma simultânea a fim de proporcionar um resultado superior comparado com a sua ação isolada (JARDINE, 2005).

O uso de agentes antimicrobianos combinados já é uma prática bastante comum no tratamento de enfermidades. Tais combinações têm como intuito potencializar o efeito antimicrobiano, desta forma estes agentes são aplicados no controle de microrganismos que apresentam resistência aos agentes de forma isolada. Barbosa (2011) evidenciou que é de grande interesse obter conhecimentos do mecanismo que determina o sinergismo entre os agentes antimicrobianos, de modo a prever quando uma associação terá a sua eficiência aumentada ou não. Na área de alimentos, as combinações de conservantes naturais com conservantes sintéticos, quando apresentam resultados eficientes permitem com que sejam utilizadas menores doses dos conservantes sintéticos propiciando um produto mais saudável,

com menor concentração de aditivos químicos. Além disto, vale ressaltar que a utilização de dois ou mais conservantes naturais, pode gerar efeito sinérgico capaz de eliminar o uso de conservantes sintéticos (CASTRO, 2010).

Em estudo realizado por Pajohi et al. (2011), a ação sinérgica de óleo essencial de sementes de *Cuminum cyminum* com a nisina, além de potencializar o efeito antimicrobiano, possibilitou a redução dos dois agentes, minimizando possíveis efeitos indesejáveis. A combinação de óleo essencial de *Mentha longifolia* com a nisina também possibilitou a redução do crescimento bacteriano, além de reduzir a concentração de óleo utilizado, evitando assim efeitos indesejáveis nas características sensoriais causado por este óleo.

Os extratos vegetais e as bacteriocinas apresentam atividade antibacteriana propiciando um caminho alternativo para as indústrias de alimentos e farmacêuticas substituindo ou complementando os agentes antimicrobianos tradicionais. A forma de atuação destes compostos no controle microbiológico se dá principalmente por efeitos bactericida ou bacteriostático, além da inibição da formação e manutenção de biofilmes (SILVA et al., 2016; MANCINI et al., 2018; SILVA et al., 2018).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e Origem da nisina e da Biomassa de *S. platensis*

Neste estudo, foram utilizados os microrganismos Gram-negativos *Escherichia coli* ETEC Bac 17ST, *Escherichia coli* ATCC 43888, *Escherichia coli* ATCC — 23922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC-10031, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 2378, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC — 9027, *Pseudomonas aeruginosa* P2381, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ATCC 292013, *Salmonella enteritidis* P3116, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo *Typhimurium* ATCC 24028, *Yersinia enterocolitica* clist 3447 e microrganismos Gram-positivos *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC-25923, *Enterococcus faecalis* ATCC-29212, *Enterococcus faecium* ATCC — 6569, *Listeria ivanovii* CLIST 2056, *Listeria innocua* CLIST 2052, *Listeria innocua* CLIST 2050, *Listeria monocytogenes* CLIST 2044, *Listeria monocytogenes* CLIST 2032, *Listeria monocytogenes* CLIST 2044 1/2a, *Listeria monocytogene* CLIST 2048, *Listeria monocytogene* CLIST 2049, *Listeria seeligeri* CLIST 2067, *Staphylococcus aureus* P2306, *Listeria monocytogenes* CLIST 2042 3b.

Todos os isolados bacterianos foram armazenados em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Neogen Culture Media, EUA) com 20% (v/v) de glicerol (Merck, Alemanha) emantidos a -20 °C. Estes isolados pertencem a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LaMBA) da UTFPR/Campus Londrina.

A reativação celular ocorreu em meio BHI caldo e incubação a 37 °C por 24h. Posteriormente, os inóculos foram transferidos para meio BHI agar, seguindo a mesma condição de incubação.

Foi utilizada a nisina comercial (Zhejiang Silver-Engineering Co-Ltd), sendo a solução estoque preparada na concentração final de 128 µg/mL diluída em água ultrapura e esterilizadas por filtração em membranas de poliestireno 0,22 µm (Millipore®).

A biomassa desidratada de *S. platensis* foi obtida em uma loja de produtos naturais da cidade de Foz do Iguaçu/PR.

## 4.2 Estratégia Experimental

Para a obtenção do extrato de *S. platensis* foram aplicadas quatro formas de extração: a extração A (alcoólica), a extração B (ultrassom), extração C (banho- álcool-acetona) e a extração D (alcóolica-ácido fórmico-sonicação). Para determinação de qual extração seria utilizada, após a obtenção dos extratos de *S. platensis*, os mesmos foram testados para 24 bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, selecionando-se três microrganismos de importância para a área de alimentos e saúde pública.

A ação sinérgica da nisina e o extrato D foi avaliada contra os três microrganismos selecionados na etapa anterior. Posteriormente, a concentração obtida no sinergismo foi avaliada quanto ao teste antimicrobiano, realizando-se a curva de crescimento; na citometria de fluxo foi utilizado a CIM dos compostos separados e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 2 pode-se visualizar um esquema da estratégia experimental.

**Figura 2 - Estratégia experimental.**



Fonte: Autoria própria (2023)

### 4.3 Extração dos Compostos Bioativos de *S. platensis*

Os compostos bioativos da biomassa desidratada de *S. platensis* foram extraídos através de 4 métodos distintos, descritos a seguir:

**Extração A)** A extração alcoólica dos compostos antimicrobianos da biomassa de *S. platensis* seguiu protocolo descrito por Parisi et al (2009), com modificações. Para tanto, 2,0 g da biomassa desidratada da microalga foi dissolvido em 20 mL de metanol. Em seguida, a solução foi mantida sob agitação durante 1 hora a 25 °C. Após a agitação, a solução foi mantida em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente, sendo acrescentado mais 20 mL de metanol. Repetiu-se a extração em agitação. Em seguida, a solução foi filtrada em papel Whatman 40, sendo o filtrado encaminhado ao rotaevaporador até eliminação completa do solvente (metanol) a partir do seu ponto de ebulição em temperatura de 78, 37 °C. Por fim, o extrato seco foi eluído em água ultrapura estéril na concentração final de 500 µg/mL.

**Extração B)** O protocolo utilizando foi o banho de ultrassom para rompimento das células da microalga e extração de compostos antimicrobianos, com protocolo descrito por Bermejo et al (2006). Uma suspensão de 10 g de *S. platensis* foi feita em 100 mL de tampão acetato (pH 5,5), seguido de homogeneização. A solução foi submetida ao congelamento por 24 h e posterior descongelamento, seguido de 10 minutos de ultrassom, com pausa de 2 minutos. A solução pós sonicação foi submetida a centrifugação a 5.000 rpm a 10 °C por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado para as análises antimicrobianas.

**Extração C)** A extração com banho-álcool-acetona foi realizada conforme metodologia descrita por Machu et al. (2015). Em uma solução de 30 mL de metanol, 1 mL de ácido acético e 69 mL de água destilada estéril foi acrescentado 10 g de *S. platensis*. A mistura foi submetida a banho-maria por 4 horas a 70 °C. Após o banho, foi acrescentado 70 mL de metanol e submetido novamente a 70 °C por 1 hora. Posteriormente, foi acrescentado 50 mL de acetona, homogeneizado e transferido para estufa a 30 °C por 1 hora, seguido de acréscimo de 70 mL de metanol e 4 horas a 20 °C. Após esse período a solução foi centrifugada por 10 minutos a 5.000 rpm, protegidos da luz. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman 40, e encaminhado

ao rotaevaporador até eliminação completa dos solventes. O extrato seco foi diluído em água ultrapura estéril na concentração final de 500 µg/mL.

**Extração D)** A extração alcóolica-ácido fórmico-sonicação seguiu protocolo descrito por Martelli et al (2020), com modificações. Uma quantidade de 10 g de *S. platensis*. foi homogeneizada em metanol-ácido fórmico (99-1). A solução foi submetida à agitação por 15 minutos a temperatura ambiente, seguido da etapa de sonicação por 15 minutos. Esta etapa foi repetida 2 vezes. A solução foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em papel Whatman 40, e o material retido no papel foi novamente submetido a extração descrita acima. Após a centrifugação, ambos sobrenadantes foram misturados e levados ao rotaevaporador até eliminação completa dos solventes a partir dos pontos de ebulição, em temperatura de 78, 37 °C e 100,5 °C respectivamente. O extrato seco foi diluído em água ultrapura estéril na concentração final de 500 µg/mL.

#### **4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *S. platensis* e nisina pelatécnica de Disco Difusão**

Os testes antimicrobianos para a avaliação dos extratos obtidos pelos métodos A, B, C e D foram conduzidos de acordo com a CLSI (2018) e conforme descrito por Abdalie Aji (2015), com modificações. Para tanto, 100 µL de suspensão bacteriana ajustada a  $1 \times 10^8$  UFC/mL foi espalhada na superfície do agar BHI. Posteriormente, discos de papel contendo os extratos A, B, C e D e a solução de nisina foram depositados na superfície do ágar, seguido de incubação a 37 °C por 24 horas e mensuração dos halos de inibição com paquímetro.

De posse dos melhores resultados referentes aos métodos de extração de *S. platensis* e bactérias alvo, foi selecionado o extrato que propiciou maior halo de inibição e três isolados bacterianos para dar continuidade com os ensaios.

#### **4.5 Efeito Inibitório da nisina e dos Extratos da *Spirulina platensis***

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *S. platensis* e nisina foi realizada em triplicata segundo metodologia de micro diluição em placas de poliestireno de 96 poços conforme preconizado pelo CLSI (Clinical and

Laboratory Standards Institute - 2018; documento M7-A). Para tanto, 100 µL de Mueller-Hinton caldo (MH-Himedia) foram depositadas nos poços da placa de microtitulação. Posteriormente, 100 µL da solução de nisina (512 µg/mL), foi depositada no eixo X da placa, seguindo de diluição seriada até a concentração final de 0,0037 µg/mL. Por fim, cada poço recebeu 10 µL da suspensão bacteriana ajustada a  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

A duas últimas linhas constaram do controle positivo, referente ao crescimento bacteriano sem nisina e somente o meio de cultura, não recebendo isolado de suspensão bacteriana. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24h. Após este período, foi acrescentado 10 µL da solução de XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide/Sigma®) a 0,125%, e as microplacas foram incubadas por mais duas horas a 37 °C.

Posteriormente, a DO foi mensurada em espectrofotômetro (BIOCHOROM) em absorbância de 595 nm. O mesmo protocolo foi realizado para o extrato de *S. platensis*, nas concentrações iniciais de 250 a 0,0015 µg/mL.

#### 4.6 Avaliação do efeito sinérgico entre nisina e extrato de *Spirulina*

Para avaliar o efeito sinérgico dos extratos de *S. platensis* e solução de nisina frente aos isolados bacterianos foi realizada a técnica de micro diluição para o ensaio *Checkerboard* (EUCAST, 2008). A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura de 24 h, até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL).

A montagem da placa seguiu o protocolo descrito anteriormente, acrescentando no eixo X a solução de nisina e no eixo Y a concentração de extrato D. Em cada poço foi adicionado 10 µL da cultura bacteriana. As microplacas foram incubadas à 37 °C por 24 h, e a leitura da DO foi realizada como descrito no item anterior. Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (índice CIF) de acordo com a Equação (1):

$$\frac{A}{MICa} + \frac{B}{MICb} = CIFA + CIFb = \text{índice CIF}$$



Onde A e B são a MIC de cada composto em combinação (em um único poço) e CIMa e CIMb são as CIM de cada composto individualmente.

O valor do índice ICIF foi usado para categorizar a interação dos dois compostos testados conforme Tabela 2 (FADLI et al., 2012).

**Tabela 2. Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.**

<b>Interação</b>	<b>ICIF</b>
<b>Sinergismo</b>	$CIF \leq 0,5$
<b>Aditivo</b>	$0,5 < CIF \leq 1$
<b>Indiferente</b>	$1 < CIF \leq 2$
<b>Antagonismo</b>	$CIF > 2$

**Legenda.** ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada; CIF: concentração inibitória fracionada.

**Fonte: Autoria própria (2023)**

#### **4.7 Curva de crescimento microbiano**

Para verificar a ação do extrato de *S. platensis* e nisina no desenvolvimento dos isolados selecionados, foi realizado o acompanhamento do crescimento celular (curva de crescimento). Para tanto, 100 µL de suspensão bacteriana ajustada a  $1 \times 10^6$  UFC/mL foi adicionada em 4 mL de caldo BHI, seguido da adição de 1 mL da solução de nisina ou extrato de *S. platensis* na concentração CIM determinada.

Os tubos foram incubados a 37 °C, e nos tempos 0, 2, 6, 12 e 24 h uma alíquota de 100µL foi retirada e realizada a leitura da densidade ótica a 540 nm; também foi retirada uma alíquota de 100 µL para a contagem em placas.

#### **4.8 Citometria de Fluxo para determinação de células mortas pelos compostos isolados nisina e extrato de *Spirulina***

O ensaio de Citometria de Fluxo foi realizado a uma taxa de <15.000 mil eventos por segundo. Sendo assim, os isolados bacterianos foram tratados com os respectivos valores de CIM de cada composto, determinadas previamente. Os tratamentos foram incubados a 37 °C por 18 h sob agitação. Após a incubação, as células foram lavadas em PBS (tampão fosfato-salino) e coradas com iodeto de propídio (30 ug/mL) (Santa Cruz Biothecology) para a diferenciação de células viáveis e não viáveis. O controle foi composto por células não tratadas e as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram adquiridos empregando o citômetro de fluxo (BD Accuri™ 6 Plus Personal Flow Cytometer).

#### **4.9 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As alterações morfológicas nos microrganismos não tratados e tratados com nisina e extrato de *S. platensis* foram avaliadas por Microscopia de Varredura (MEV) (FEI Quanta 200 Scanning Electron Microscope). A cultura celular foi incubada com as substâncias antimicrobianas da CIM e sinergismo a 37 °C por 18 h. Antes da observação, as células foram tamponadas com tampão cacodilato pH 7,2 e glutaraldeído a 3% por 30 min, depois lavadas duas vezes com tampão e tratadas com 1% tetróxido de ósmio de Zetterquist por 30 minutos.

As amostras fixadas foram desidratadas com uma série ascendente de etanol

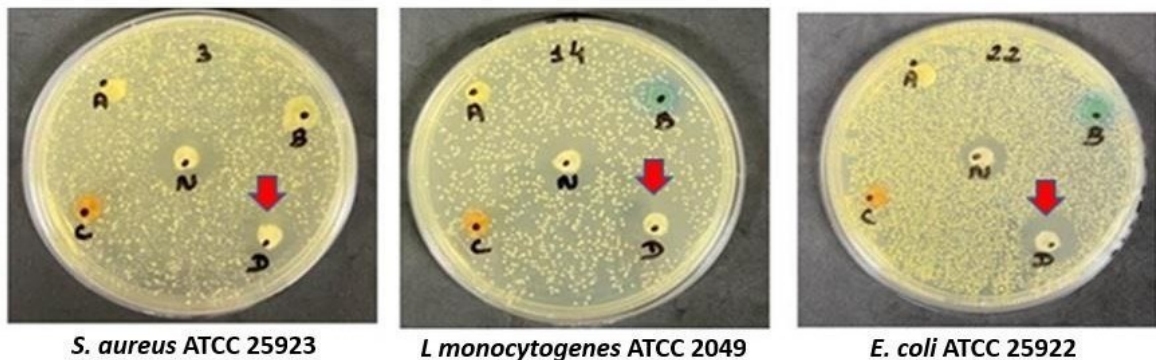
(50, 60, 70, 80, 90 e 100%) por 10 minutos em cada concentração. Todos os espécimes foram secos sob vácuo e revestidos com uma fina película de ouro. O material foi visualizado em modo de altovácuo a 5 kv.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito Inibitório da nisina e Extratos de *S. platensis*

Os halos de inibição formados para as bactérias teste mais afetadas pelos extratos de *S. platensis* e nisina estão apresentados na Figura 3.

**Figura 3 - Técnica de disco difusão dos extratos de *S. platensis*, sendo A (extração alcoólica, B (ultra-som-centrifugação), C (banho-álcool-acetona), D (alcóolica-ácido fórmico-sonicação), e N (nisina), destacando o halo de inibição formado (seta).**



Fonte: Autoria própria (2023)

Na Tabela 3 estão apresentados os microrganismos que foram inibidos pelos extratos de *S. platensis*, bem como o tamanho dos halos de inibição formados. Nos extratos obtidos pelos protocolos A (alcoólico), B (ultra-som-centrifugação) e C (banho-álcool-acetona), não houve a formação de halo de inibição visível, para nenhuma bactéria testada; para alguns isolados, observou-se uma zona de inibição difusa, não claramente delimitada e com presença de muitas colônias ao redor do extrato testado. Para o extrato D (alcóolica-ácido fórmico-sonicação) obteve-se um nítido halo de inibição em 91% das cepas testadas.

O extrato de *S. platensis* apresentou maior eficiência antimicrobiana no controle de bactérias Gram-negativas quando comparado com a nisina; já para as bactérias Gram-positivas a eficiência variou de acordo com o isolado; a cepa *L. monocytogenes* CLIST 2042 apresentou maior halo de inibição com o extrato D de *S. platensis*.

**Tabela 3 - Valores de halos de inibição de bactérias Gram-positivas (+) com extratos de *S. platensis* e nisina.**

Bactérias Gram Positivas (+)	Extrato A	Extrato B	Extrato C	Extrato D	Nisina
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC – 6569	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2050	-	-	-	18	-
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2052	-	-	-	18	13
<i>Listeria ivanovii</i> CLIST 2056	-	-	-	15	18
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIST 2032	-	-	-	15	17
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIST 2048	-	-	-	18	17
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIST 2049	-	-	-	16	18
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIST 2042 3b	-	-	-	30	19
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIST 2044	-	-	-	14	14
<i>Listeria monocytogenes</i> CLIST 2044 1/2 <sup>a</sup>	-	-	-	10	15
<i>Listeria seeligeri</i> CLIST 2067	-	-	-	14	17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923	-	-	-	15	18
<i>Staphylococcus aureus</i> P2306	-	-	-	15	16

**Legenda.** (-) ausência de halo de inibição.

**Fonte: Autoria própria (2023)**

**Tabela 4 - Valores de halos de inibição de bactérias Gram-negativas.**

<b>Bactérias Gram Negativas (-)</b>	<b>Extrato A</b>	<b>Extrato B</b>	<b>Extrato C</b>	<b>Extrato D</b>	<b>Nisina</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				19	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43888				20	11
<i>Escherichia coli</i> ETEC Bac 17ST					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 2378				13	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC-10031				15	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P2381				17	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC – 9027					
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 292013				15	13
<i>Salmonella enteritidis</i> P3116				16	
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 24028				14	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				19	16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 43888				20	11
<i>Escherichia coli</i> ETEC Bac 17ST					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 2378				13	
<i>Yersinia enterocolitica</i> clist 3447				19	

**Fonte: Autoria própria (2023)**

Muitos estudos confirmaram e relataram que a nisina se liga ao lipídio II (o precursor do peptidoglicano), levando à formação de poros e inibição da biossíntese da parede celular (SUGANTHI et al., 2012; BAG e CHATTOPADHYAY, 2017). Relatos do impacto do efeito da nisina em bactérias Gram-negativas podem apresentar resultados variáveis que variam de efeitos ineficazes a significativos.

Essa variação de ação tem limitado a utilização deste peptídeo antimicrobiano no controle de patógenos alimentares (SUGANTHI et al., 2012; BAG e CHATTOPADHYAY, 2017; GALVÁN MÁRQUEZ et al., 2020). Os dados abordados por estes autores corroboram com os obtidos neste trabalho, mostrando a baixa eficiência da nisina comercial contra isolados de *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp* e *Salmonella spp*.

O extrato de *S. platensis* extraído no protocolo D mostrou-se mais eficaz no controle de *E. coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp* e *Salmonella spp*, *Listeria spp*, *Staphylococcus* e *Yersina*. *S. platensis* é uma excelente fonte de metabólitos secundários bioativos, além de carboidratos, vitaminas proteicas, mineiras, ácidos graxos essenciais ou fibras alimentares (MACHU et al., 2015).

Os metabólitos secundários bioativos incluem polifenóis, ácidos fenólicos, tocoferóis e ácido linolênico que exibem diversas atividades, tais como anticancerígenas, anti-inflamatórias, antioxidantes, neuroprotetoras, hepatoprotetoras e antimicrobianas (MAZUR et al., 2015; MOHAMMAD et al., 2021).

O protocolo e solventes evaporados e utilizados no processo de extração desses metabólitos influenciam muito a atividade antimicrobiana (TÜNEY et al., 2006; ABEDIN et al., 2008). Neste estudo, o protocolo mais responsivo para a extração de compostos bioativos foi a utilização de álcool e ácido fórmico, seguido de sonicação.

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo são destacados por Mohammad et al. (2021); segundo estes autores, os solventes utilizados na extração foram evaporados a partir do seu ponto de ebulição e até secagem completa dos mesmos, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. A atividade antimicrobiana da *S. platensis* se deve a presença de compostos fenólicos, constituídos por grandes moléculas de cadeia aromática com um grupo hidroxila. Estes compostos podem ser influenciados por diversos fatores, como origem geográfica, variações ambientais, fisiológicas e nutricionais da alga (MARINHO-SORIANO et al., 2006). Além destes compostos, os ácidos  $\gamma$ -linolênico, graxo, láurico e palmitoléico também podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana desta

microalga (MENDIOLA et al., 2007). Todos estes fatores associados podem indicar o potencial para utilizar esses compostos em ação sinérgica com outras substâncias antimicrobianas.

Para os testes de sinergismo, citometria e MEV foram selecionados os microrganismos *E. coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 2049 e *S. aureus* ATCC 25923, por apresentarem sensibilidade à nisina e extrato de *Spirulina*, e serem representativas de bactérias Gram-positivas e negativas.

## 5.2 Efeito Inibitório e Teste de *Checkerboard*

Foram determinados os valores da CIM da nisina e do extrato D de *S. platensis*, isoladas e em combinação. Os dados estão apresentados na Tabela 5. Observou-se que a nisina e o extrato de *S. platensis* apresentaram valores de CIM variados sendo destacado o menor valor de CIM para *L. monocytogenes* com *S. platensis*.

Por outro lado, os valores de CIM dos componentes em combinação diminuíram para todas as bactérias testadas, e os valores apresentados mostraram interação antibacteriana sinérgica entre os compostos. O ICIF variou de 0,18 a 0,302, mostrando interação sinérgica para todos isolados selecionados.

A combinação de nisina com compostos naturais e suas possíveis interações sinérgicas facilitam seu uso como conservantes naturais de alimentos, aumentando seu espectro de ação. Neste estudo, selecionou-se o isolado de *E. coli* ATCC 25922 sensível a ação de nisina e extrato de *S. platensis* e foi mostrado que a ação sinérgica reduziu consideravelmente a CIM. Já os isolados de *L. monocytogenes* ATCC 2049 e *S. aureus* ATCC 25923 foram selecionados por apresentarem sensibilidade maior à nisina quando comparado aos compostos bioativos da *S. platensis*; em ambos os casos o sinergismo foi avaliado, com redução no valor de CIM para nisina. Estes dados revelam que uma quantidade mínima de nisina (0,12 e 0,5 µg/mL) combinada com *S. platensis* tem eficiência antimicrobiana contra os patógenos mencionados acima.

Ainda são escassos os relatos de ação sinérgica entre nisina e *S. platensis*. A combinação sinérgica de nisina já foi determinada com antimicrobianos (KITAZAKI et al., 2017), óleos essenciais (LI et al., 2022), polifenóis de plantas (GRENIER et al., 2020), e peptídeos antimicrobianos (ROSHANAK et al., 2020), destacando as principais vantagens do sinergismo (i) aumento da atividade dos antimicrobianos por meio de seu uso em combinação, (ii) diminuição das doses necessárias dos



compostos e (iii) aumento o espectro de atividade (SZABO et al., 2010; BAG e CHATTOPADHYAY, 2017).

**Tabela 5 - Valores de concentração inibitória fracionada (CIF) da nisina com extrato de *S. platensis* em combinação contra células planctônicas de bactérias de origem alimentar.**

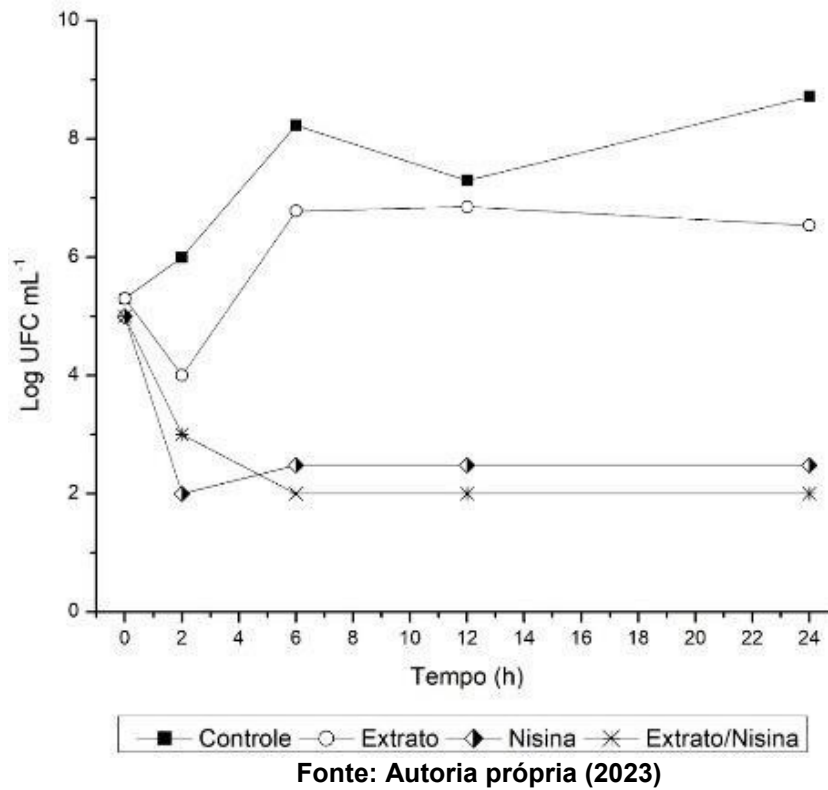
Bactéria	Substância Teste	CIM (µg/mL)		ICIF	Efeito
		Isolados	Combinados		
<b><i>S. aureus</i> ATCC 25923</b>	Nisina	0,12	0,0078	0,302	Sinergismo
	<i>S. Platensis</i>	0,5	0,12		
<b><i>L. monocytogenes</i> ATCC 2049</b>	Nisina	0,5	0,0078	0,25	Sinergismo
	<i>S. Platensis</i>	0,06	0,015		
<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>	Nisina	0,5	0,03	0,18	Sinergismo
	<i>S. Platensis</i>	0,5	0,062		

**Legenda.** CIM: Concentração Inibitória Mínima; ICIF: Índice de Concentração Inibitória fracionada.

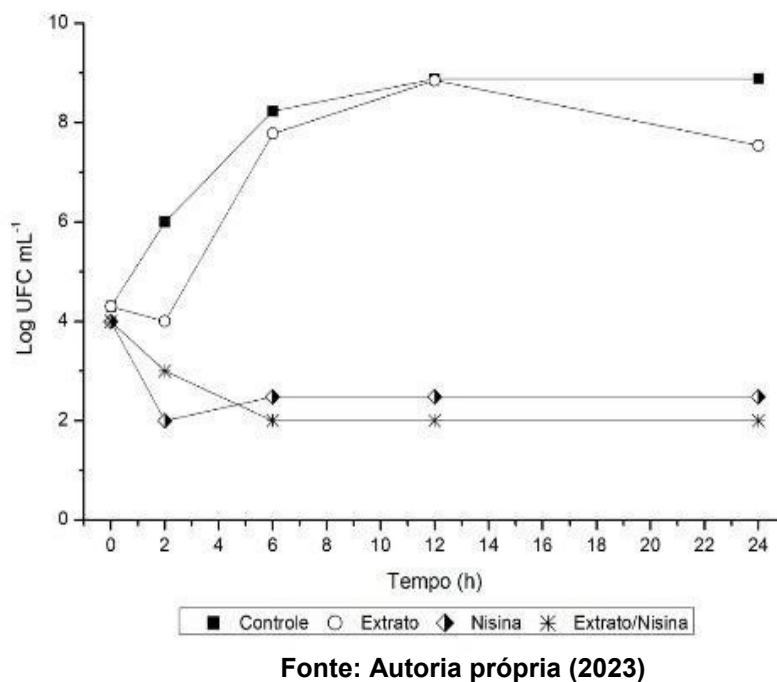
**Fonte: Autoria própria (2023)**

O efeito da nisina e do extrato de *S. platensis* foi avaliado individualmente e em combinação no crescimento das bactérias teste através da construção de uma curva, nos tempos 0, 2, 6, 12 e 24 horas (Gráfico 1). Os dados mostram que a nisina isolada e em combinação com o extrato de *S. platensis*, apresentam efeito bactericida, já nas primeiras 2 h de incubação. É evidente que o efeito inibitório com a ação combinada de ambas substâncias foi contundente, mesmo após 24 h de incubação, chegando a cargas microbianas baixas para todos os microrganismos testados, corroborando com os dados de sinergismo. Esses resultados são importantes quando se trata de controlar o crescimento de bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, uma vez que torna possível utilizar quantidades reduzidas desses compostos antimicrobianos e ter um bom efeito em relação a inocuidade desejada nos alimentos.

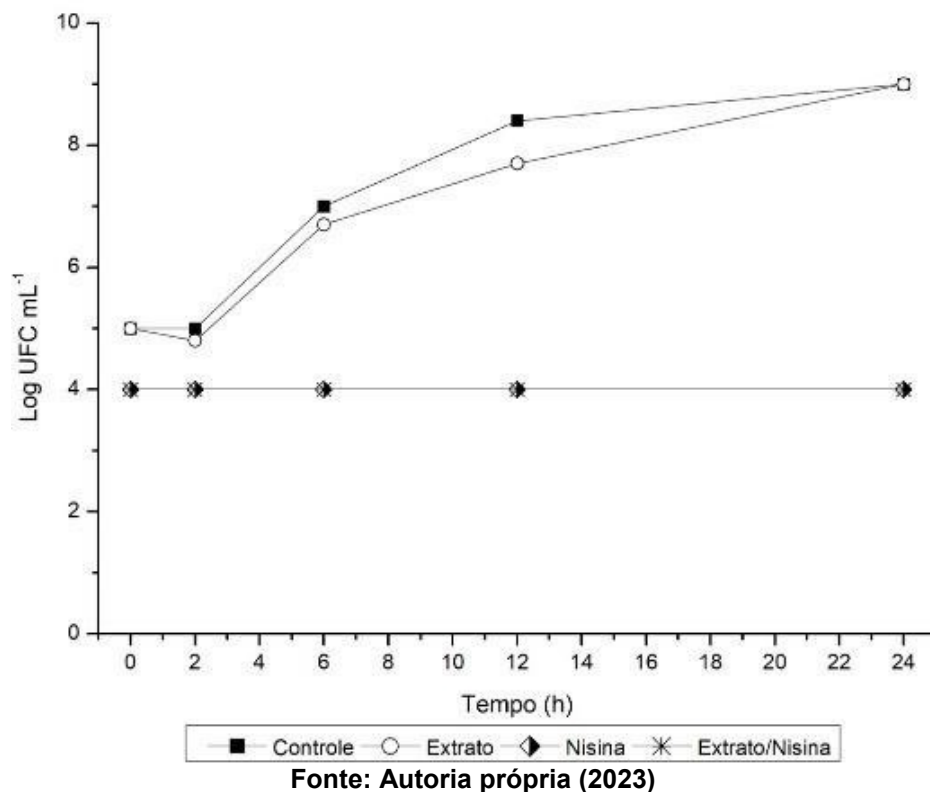
**Gráfico 1 - Curvas de crescimento de *Escherichia coli* na presença de nisina e extrato de *S. platensis*, isoladamente e em combinação.**



**Gráfico 2 - Curvas de crescimento de *S. aureus* na presença de nisina e extrato de *S. platensis*, isoladamente e em combinação.**



**Gráfico 3 - Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* na presença de nisina e extrato de *S. platensis*, isoladamente e em combinação.**



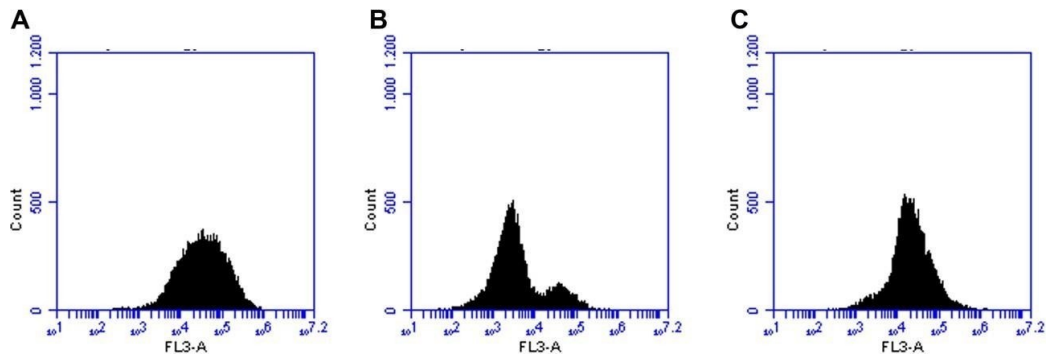
### 5.3 Citometria de Fluxo e Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de citometria de fluxo foi realizada para obter uma indicação do local de lesão das bactérias teste após tratamento com nisina e extrato de *S. platensis*, isoladamente. Os gráficos 6, 7 e 8 representam a citometria das bactérias *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente.

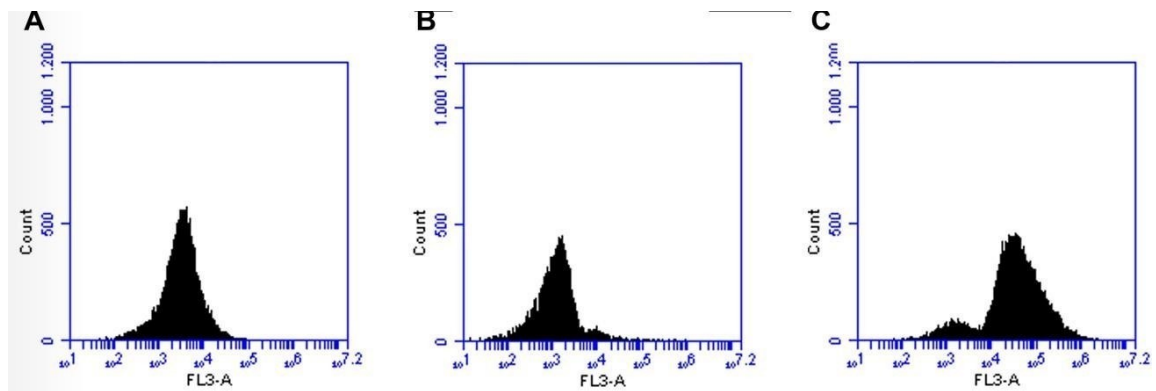
A coloração fluorescente com iodeto de propídio (IP) foi usada para visualizar a população morta e/ou comprometida, pois o IP entra nas células que perderam a integridade da membrana e se liga aos ácidos nucleicos. Os pontos deslocados para o quadrante a esquerda são indicativos de morte celular.

A citometria de fluxo possibilita a obtenção de informações sobre o número e a viabilidade de microrganismos e perturbações resultantes da ação de agentes físicos e químicos, em um período mais curto de tempo (SHAPIRO, 2001).

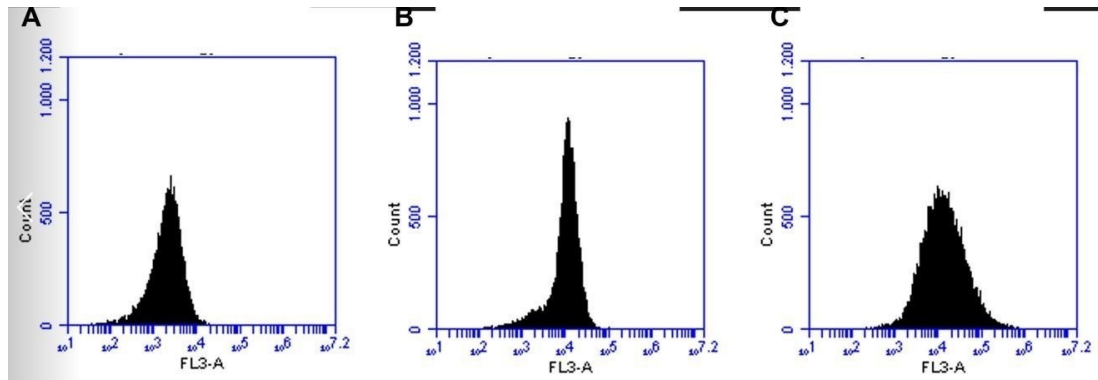
**Gráfico 4 - Gráficos de intensidade de fluorescência de células de *Escherichia coli* coradas com IP; (A) células controle, sem tratamento com antimicrobianos; (B) células tratadas com extrato de *Spirulina platensis*; (C) células tratadas com nisina.**



**Gráfico 5 - Gráficos de intensidade de fluorescência de células de *Listeria monocytogenes* coradas com IP; (A) células controle, sem tratamento com antimicrobianos; (B) células tratadas com extrato de *Spirulina platensis*; (C) células tratadas com nisina.**



**Gráfico 6 - Gráficos de intensidade de fluorescência de células de *Staphylococcus aureus* coradas com IP; (A) células controle, sem tratamento com antimicrobianos; (B) células tratadas com extrato de *Spirulina platensis*; (C) células tratadas com nisina.**



Fonte: Autoria própria (2023)

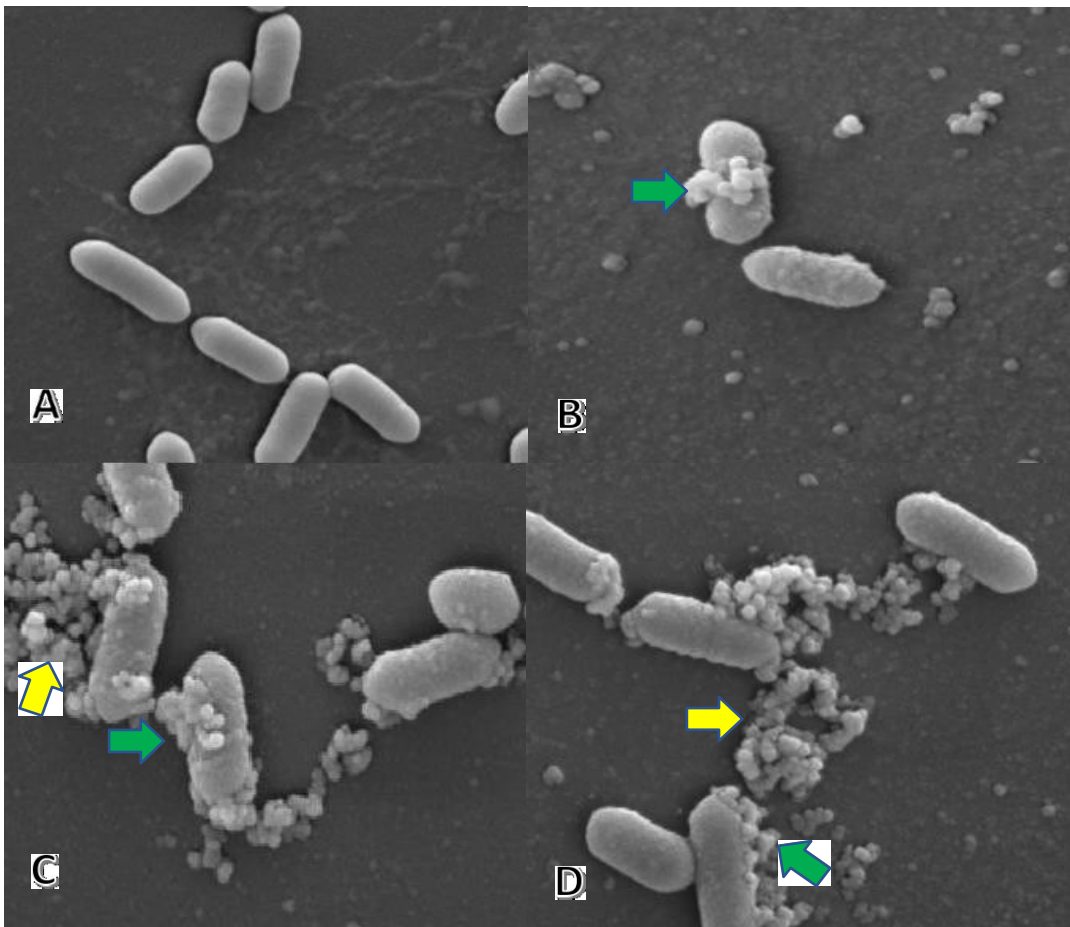
Foi observado em todos os tratamentos que as células de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* foram mais afetadas pelo extrato de *S. platensis* do que a nisina, indicando assim a ação deletéria dos compostos antimicrobianos da *S. platensis*. Os dados de citometria corroboram com os valores de UFC obtidos. Os resultados sugeriram que, após o tratamento dos isolados com nisina e extrato de *S. platensis*, houve alteração da membrana celular dos microrganismos utilizados, aumentando a permeabilidade da membrana e facilitando a penetração do iodeto de propídio, assim indicando lesão celular.

A investigação das alterações morfológicas da atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* tratados por nisina, extrato de *S. platensis* e a combinação de ambas substâncias foram investigadas por MEV (Figura 4). As células não tratadas mostraram suas formas únicas (forma de bastonetes) (Figura 4 A). As células tratadas com os compostos antimicrobianos, após 18 h de incubação, apresentaram a superfície celular com aspecto rugoso, indicando a disruptura da parede celular e formação de vesículas (Figuras 4 B, C e D setas verdes). Algumas células foram completamente destruídas, sendo observada apenas uma massa amorfa, sugerindo restos celulares (Figuras 4 B, C e D - setas amarelas).

A nisina forma poros na membrana celular que acarreta na desintegração celular em diversas pequenas seções, explicando assim as presentes observações de disruptura da integridade da parede celular (ZHOU et al., 2014). O mesmo efeito foi observado com o extrato de *S. platensis*. Assim, propõe-se que, além do dano terminal

à parede e membrana celular, o extrato pode ter propiciado o rompimento celular, corroborando com os dados obtidos pela citometria.

**Figura 4 - Efeito do tratamento de *Listeria monocytogenes*; em (A) células controle, sem tratamento; (B) células tratadas com nisina; (C) células tratadas com extrato de *S. platensis*; (D) células tratadas com nisina e extrato de *Spirulina platensis*; seta: massa amorfa; aumento de 30.000x.**



Fonte: Autoria própria (2023)

## 6 CONCLUSÕES

Foram testados 4 protocolos de extração de compostos antimicrobianos da biomassa de *S. platensis*, sendo o método de extração alcóolica-ácido fórmico-sonicação o que apresentou ação antimicrobiana contra as bactérias testadas.

Dos 24 isolados testados, o extrato de *S. platensis* apresentou atividade antimicrobiana contra 21 isolados, compreendendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Foi confirmada a ação sinérgica de nisina com extrato de *Spirulina platensis* contra as bactérias *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

As técnicas de citometria de fluxo e MEV corroboraram os testes de mensuração de UFC, confirmando a alteração da membrana citoplasmática e morte bacteriana.

## REFERÊNCIAS

- ABEDIN, R. M.A.; TAHA, H. M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global journal of biotechnology and biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.
- ABDALI, H.; AJJI, A. Desenvolvimento de estruturas e filmes antibacterianos usando cravo em pó. **Ind. culturas prod.**, v. 72, p. 214–219, 2015.
- ADEM, G.; NADIA, O.; CATHERINE, J.; & PASCAL, D. (2015): Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity and Main Uses, **Critical reviews in food science and nutrition**, DOI: 10.1080/10408398.2013.763765
- AKBAR, A.; KUMAR-ANAL, K. A. Food safety concerns and food-borne pathogens, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Campylobacter*. **FUUAST journal of biology**. 2011;1(1): 5–17.
- ALSHUNIABER, M. A.; KRISHNAMOORTHY, R.; ALQHTANI, W. H. Antimicrobial activity of polyphenolic compounds from *Spirulina* against food-borne bacterial pathogens. **Saudi journal of biological sciences**, v. 28, n. 1, p. 459-464, 2021.
- AMBROSI, M. A. *et al.* Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, 2008.
- ANITHA, L. *et al.* Effect of supplementation of *Spirulina* on blood glucose, glycosylated hemoglobin and lipid profile of male non-insulin dependent diabetics. **Asian journal of experimental biological sciences**, v. 1, n. 1, p. 36-46, 2010.
- ASIOLI, D. *et al.* Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food research international**, v. 99, p. 58-71, 2017.
- BACON, D.R. (2003). A comparison of approaches to importance/performance analysis. **International journal of market research**, 45 (1), 55-71.
- BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R. R. Synergistic antibacterial and antibiofilm efficacy of nisin in combination with p-coumaric acid against food-borne bacteria *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium*. **Letters in applied microbiology**, v. 65, n. 5, p. 366-372, 2017.
- BATISTA, A. P. *et al.* Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. **Algal research**, v. 26, n. June, p. 161–171, 2017.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.



BERMEJO, R. *et al.* Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. **Chromatographia**, v. 63, n. 1, p. 59-66, 2006.

BHINGARDE, S.; NIMSE, A. *Spirulina* farming: a superfood. **Just agriculture e-newsletter**, v. 2, n. 6, 2022.

BOUHLAL, R. *et al.* Atividades antivirais de polissacarídeos sulfatados isolados de *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) e *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). **Marine drugs**, v. 9, p. 1187-1209, 2011.

CARREIRA, C. M. *et al.* Efeitos biológicos da *Spirulina* sp. e suas possíveis implicações na prevenção do câncer. **Revista terra & cultura: cadernos de ensino e pesquisa**, [S.l.], v. 28, n. 54, p. 97-106, jul. 2018. ISSN 2596-2809.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I.C.F.R. Natural food additives: Quovadis?. **Trends in food science & technology**, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CASTRO, P.G. M (2010) Desenvolvimento de processo fermentativo para a produção de ácido propiônico a partir da fração hemicelulósica de bagaço de sorgo sacarino [sorghum bicolor (L.) moench]. **Dissertação de mestrado em tecnologia e processos químico e bioquímicos**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 8-13.

ÇELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M.; BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. **Bioresource technology**, v. 100, n. 14, p. 3625-3629, 2009.

Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard CLSI document M07-A10, 10th ed. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute (2018).

CONTE, F. A. Efeitos do consumo de aditivos químicos alimentares na saúde humana. **Revista espaço acadêmico**, 2016; 16 (181): 69-81.

DA SILVA, F. L. *et al.* Development of ice cream with reduction of sugar and fat by the addition of inulin, *Spirulina platensis* or phycocyanin. **International journal of gastronomy and food science**, v. 27, p. 100445, 2022.

DA SILVA, S. C. *et al.* Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. **Journal of functional foods**, v. 60, Junho, 2019.

DA SILVA, S. P.; DO VALLE, A. F.; PERRONE, D. Microencapsulated *Spirulina maxima* biomass as an ingredient for the production of nutritionally enriched and sensorially well-accepted vegan biscuits. **LWT**, v. 142, p. 110997, 2021.

DA SILVA, V. B. *et al.* Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current opinion in food science**, v. 7, p. 73-77, 2016.

DE MELO, N. *et al.* Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista ceres**, v. 52, n. 304, 2005.

DE MORAIS, M. G. *et al.* Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **Bio Med research international**, v. 2015, 2015.

DEFOIRDT, T. Alternativas aos antibióticos para controlar infecções bacterianas: vibrios luminescente na aquicultura como exemplo. **Trends in biotechnology**, v. 25, p. 472-479, 2007.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisina como conservante de alimentos. **Alimentos aust.** 57: 525-527, 2005.

DENG, W. *et al.* Controlando interações genômicas de longo alcance em um locus nativo por amarração direcionada de um fator de looping. **Célula**, v. 149, p. 1233-1244, 2012.

DENG, R.T.; CHOW, T.J. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular therapeutics**, v. 28, n. 4, p. 33-4, 2010.

EL-SHEEKH, M. M.; DABOOR, S. M.; SWELIM, M. A.; MOHAMED, S. Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. **Iranian journal of microbiology**, v. 6, n. 2, p. 112-119, 2014.

EUCAST. Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antimicrobials. **Clin. Microbiol. Infect.** 2008, 14: 982-984.

FADLI, M. *et al.* Antibacterial activity of *thymus maroccanus* and *thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection–bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 464-471, 2012.

FRADINHO, P. *et al.* Effect of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. **Algal research**, v. 45, n. 3 Junho, 2020.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182 p.

GALVÁN, M. I. J. *et al.* Mode of action of nisin on *Escherichia coli*. **Canadian journal of microbiology**, v. 66, n. 2, p. 161-168, 2020.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5. ed. Barueri: Manole, p. 629, 2015.

GOUDA, K.G.M., KAVITHA, M.D., SARADA, R. Antihyperglycemic, antioxidant and antimicrobial activities of the butanol extract from *Spirulina platensis*. **Journal food biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 594-602, 2015.

GOUVEIA, L. *et al.* Microalgae–source of natural bioactive molecules as functional ingredients. **Food sci technol bull funct foods**, v. 7, n. 2, p. 21-37, 2010.

GRAHL, S. *et al.* Alternative protein sources in western diets: Food product development and consumer acceptance of spirulina-filled pasta. **Food quality and preference**, v. 84, Agosto, 2019, p. 103933, 2020.

GRENIER, D. *et al.* Biocompatible combinations of nisin and licorice polyphenols exert synergistic bactericidal effects against *Enterococcus faecalis* and inhibit NF- $\kappa$ B activation in monocytes. **AMB express**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; ARUOMA, O.I. O método de desoxirribose, um ensaio simples de “tubo de ensaio” para determinação de constantes de velocidade para reações de radicais hidroxila, **Analytical biochemistry**, v. 165, p. 215–219, 1987.

HENRIKSON, R. Earth food Spirulina: How this remarkable blue-green algae can transform our health and our planet. Ronore Enterprises. **Inc., Hana**, 2009.

IKEDA, I. K. *et al.* **Avaliação do extrato fermentado e bioativo da biomassa de *Spirulina platensis* como potencial prebiótico cutâneo**. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

KITAZAKI, K. *et al.* In vitro synergistic activities of cefazolin and nisin A against mastitis pathogens. **Journal of veterinary medical science**, p. 17-0180, 2017.

KORU, E. Earth food *Spirulina (Arthrospira)*: Production and quality standards. **Food additive**, p. 191-202, 2012.

KUMAR, S. N. *et al.* Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3143-3150, 2012.

LAFARGA, T. Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. **Algal research**, v. 41, p. 101566, 2019.

LI, Q. *et al.* Synergistic antibacterial activity and mechanism of action of nisin/carvacrol combination against *Staphylococcus aureus* and their application in the infecting pasteurized milk. **Food chemistry**, v. 380, p. 132009, 2022.

LUCAS, B. F. *et al.* Snack bars enriched with *Spirulina* for school children nutrition. **Food science and technology**, v. 40, p. 146-152, 2019.

LUM, K. K.; KIM, J.; LEI, X. G. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2013.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R. E. HILL, C. Lantibióticos: estrutura, biossíntese e modo de ação. **FEMS microbiol. Ap.** 25: 285–308, 2001.

MACHU, L. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1118-1133, 2015.

MAO, T. K.; WATER, J. Van de; GERSHWIN, M. Eric. Effects of a Spirulina-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. **Journal of medicinal food**, v. 8, n. 1, p. 27-30, 2005.

MARCOCCI, L.; PACKER, L.; DROY-LEFAIX, M.T. Ação antioxidante do extrato de *Ginkgo biloba* EGB 761, **Methods in enzymology**, v. 234, p. 462-475, 1994.

MARINHO-SORIANO, E. *et al.* Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource technology**, v. 97, n. 18, p. 2402-2406, 2006.

MARTELLI, F. *et al.* Edible seaweeds and spirulina extracts for food application: Invitro and in situ evaluation of antimicrobial activity towards foodborne pathogenic bacteria. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1442, 2020.

MARUYAMA, S.; STRELETSKAYA, N. A.; LIM, J. Clean label: Why this ingredient but not that one? **Food quality and preference**, v. 87, p. 104062, 2021.

MATOS, J. *et al.* Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. **Food & function**, v. 8, p. 2672-2685, 2017.

MAZUR-MARZEC, H. *et al.* Baltic cyanobacteria—a source of biologically active compounds. **European journal of phycology**, v. 50, n. 3, p. 343-360, 2015.

MENDIOLA, J. A. *et al.* Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1357-1367, 2007.

MENEGOTTO, A. L. L. *et al.* Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT**, v. 114, p.108267, 2019.

MISRA, N. N. *et al.* Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. **Food research international**, v. 97, p. 318-339, 2017.

MORAES, C. C. *et al.* C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 28, p. 45-49, 2011.

NARMADHA, T. *et al.* Effect of *Spirulina* on lipid profile of hyperlipidemics. **World journal of science and technology**, v. 2, n. 1, 2012.

ÖZDEMİR, G.; KARABAY, N. U.; DALAY, M. C.; PAZARBASI B. Atividade antibacteriana de componentes voláteis e vários extratos de *spirulina platensis*. **Phytotherapy research**, v. 18, p. 754-757, 2018.

PARISI, A. S. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 30, n. 3, 2009.

PRATES, D. F. *et al.* Atividade antioxidante de ficocianina extraída de *Spirulina* cultivada com LEDs. **Blucher biochemistry proceedings**, v. 1, n. 2, p. 259- 262, 2015.

REMPEL, A. *et al.* Saccharification of *Spirulina platensis* biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. **Bioresource technology**, v. 263, p. 163-171, 2018.

ROSHANAK, S. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of buforin I and nisin and the synergistic effect of their combination as a novel antimicrobial preservative. **Journal of food protection**, v. 83, n. 11, p. 2018-2025, 2020.

SAELIM, K.; JAMPAPHAENG, K.; MANEERAT, S. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* S0/7 isolated fermented stinky bean (Sa Taw Dong) and its use as a starter culture. **Journal of functional foods**, v. 38 part A, p. 370-377, 2017.

SANTIAGO-SANTOS, M. C. *et al.* Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SALES, L. E. M. *et al.* Avaliação da carne suína in natura comercializada em Mossoró-RN. **Acta veterinaria brasilica**, v. 7, n. 4, p. 306-310, 2013.

SERNA, D. C; *et al.* Nisina como conservante de alimentos: revisão sistemática de literatura. **Hechos microbiológicos**, v. 6, n. 1-2, p. 52-64, 2015.

SHAPIRO, H. M. (2000) Microbial analysis at the single-cell level: Tasks and techniques. **J. microbiol. Meth.** 42, p. 3–16.

SILVA, A. A. *et al.* Metabolic extract of the endophytic fungus *Flavodon flavus* isolated from *Justicia brandegeana* in the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in commercial orange juice. **International journal of food microbiology**, v. 338, p. 109019, 2021.

SILVA, S.C. *et al.* Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. **Journal of functional foods**, v. 60, 2019.

SIMPORE, J. *et al.* Reabilitação nutricional de crianças desnutridas utilizando espirulina em pó. **Nutrition journal**, v. 5, p. 3, 2006.

SUGANTHI, V. *et al.* Lantibiotic nisin: natural preservative from *Lactococcus lactis*. **International research journal of pharmacy**, v. 3, p. 13-9, 2012.

SZABO, M. R. *et al.* Antioxidant and antimicrobial properties of selected spice extracts. **International journal of food properties**, v. 13, n. 3, p. 535-545, 2010.

TIEPO, C. B. V. *et al.* Addition of *Spirulina platensis* in handmade ice cream: Physicochemical and sensory effects. **Brazilian journal of development**, v. 7, n. 9, p. 88106–88123, 2021.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Procariotos: domínios bacteria e archaea. **Microbiologia**, p. 319-320, 2012.

TÜNEY, İ. et al. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). **Turkish journal of biology**, v. 30, n. 3, p. 171- 175, 2006.

VONSHAK, Avigad (Ed.). **Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology**. CRC press, 1997.

YAAKOB, Z. *et al.* An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. **Journal of biological research-thessaloniki**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2014.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. Método de HPLC para avaliação da atividade de eliminação de radicais livres de alimentos usando 1,1,-difenil-2-picrilhidrazil, Biosci. **Biotecnologia e bioquímica**, v. 62, p. 1201- 1204, 1998.

ZEN, C. K. *et al.* Development of functional pasta with microencapsulated Spirulina: technological and sensorial effects. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 100, n. 5, p. 2018–2026, 2020.

ZHOU, H. *et al.* Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. **Annals of microbiology**, v. 64, n. 2, p. 413-420, 2014.