

JULIANA DE OLIVEIRA RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE CONSERVANTES
ANTIMICROBIANOS DE BASE NATURAL E
AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM BEBIDAS NÃO
ALCOÓLICAS



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
JULHO / 2022

Trabalho realizado no Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química da UFRJ, sob a orientação dos Professores Elcio Ribeiro Borges., DSc e Anita Ferreira do Valle., DSc.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Ribeiro, Juliana de Oliveira
R484d Desenvolvimento de conservantes antimicrobianos
de base natural e avaliação de desempenho em bebidas
não alcoólicas / Juliana de Oliveira Ribeiro. -- Rio
de Janeiro, 2022.
59 f.

Orientador: Elcio Ribeiro Borges.
Coorientadora: Anita Ferreira do Valle.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Conservantes naturais. 2. Microalgas. 3.
Bebidas não alcoólicas. 4. Levulinato de cálcio. 5.
Ácido p-anísico. I. Borges, Elcio Ribeiro, orient.
II. Valle, Anita Ferreira do, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: Juliana de Oliveira Ribeiro
DRE: 118114694

BANCA EXAMINADORA: Profa. Eliane Ferreira Oliveira (Presidente)
 Prof. Mateus Gomes de Godoy
 Prof. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho (Suplente)

Título da Monografia: “**Desenvolvimento de conservantes antimicrobianos de base natural e avaliação de desempenho em bebidas não alcoólicas**”

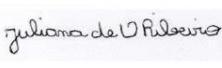
Local: Sala virtual <https://meet.google.com/jbb-xuyu-rip?pli=1>
 Data e hora de início: **28 de julho de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 28 de Julho de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>9,0</u>	Profa. Eliane Ferreira Oliveira
<u>9,0</u>	Prof. Mateus Gomes de Godoy
<u> </u>	Prof. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa
<u>9,0</u>	Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Presidente da banca 
Eliane de Oliveira Ferreira
Profa. Eliane de O. Ferreira
Instituto de Ciências Biológicas
UFRJ - M71004

Aluno: 
Juliana de Oliveira Ribeiro

Orientador: 
Prof. Elcio Ribeiro Borges / Coorientador: Dra. Anita Ferreira do Valle

Coordenador
de TCC 
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

A graduação foi o início da realização de um dos meus maiores sonhos e um grande desafio pessoal. Me permitiu ser mais humana, madura e moldou um tanto do que sou hoje. Foi uma jornada intensa de dedicação, descobertas, obstáculos e, sobretudo, autoconhecimento. Sou grata a Deus por ter me dado resiliência e coragem para lidar com todos os altos e baixos vivenciados.

Aos meus pais, por terem me apoiado desde quando ingressar na universidade era apenas a semente de um desejo. Eu não teria chegado até aqui sem todo o incentivo, investimento financeiro e, principalmente, compreensão, amor e amparo emocional. Essa conquista é nossa pois é fruto de todos os sacrifícios que fizeram por mim ao longo dos anos, para que eu pudesse alcançar grandes voos e ser genuinamente feliz.

À minha irmã Mariana, que mesmo sendo tão nova, sempre foi meu abrigo e ponto de calmaria ao chegar em casa. À minha tia Yara por ter me recebido com todo amor e carinho em sua casa para que eu pudesse ter uma rotina menos estressante e mais saudável.

Ao meu orientador Elcio e minha coorientadora Anita por todo o direcionamento, paciência e confiança, sempre me instigando a buscar pela minha evolução. Às minhas antigas orientadoras Daniela Alviano e Celuta Alviano pelo acolhimento, suporte e pelo apoio quando decidi estagiar em uma área completamente diferente ao que estava inserida.

A todos os colegas e professores que, diretamente e indiretamente, me inspiraram na profissional que desejo ser. Em especial, à Giovanna Trebisacce, minha companheira desde o primeiro dia, e à Adrielly Carmo por terem sido minha força e alegria nesses 4 anos e por não terem soltado a minha mão quando era difícil de suportar; meu coração é profundamente grato pela nossa amizade tão fiel e verdadeira que ultrapassou os muros da universidade e se tornou essencial na minha vida.

À Marianna Villares e à Millena Salles, agradeço a parceria incrível nos momentos alegres e difíceis que escolheram dividir comigo. As duas foram de extrema importância na minha caminhada e vou levar comigo com muito carinho.

Às minhas melhores amigas da vida: Isabela, Júnia, Alice, Nicolle, Breno e Mariana. Obrigada por terem acompanhado de perto toda a minha trajetória, por vibrarem com cada uma das minhas conquistas e acreditarem em mim quando eu menos consegui. Sorte grande de tê-las como irmãs de jornada.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da UFRJ pelo financiamento da minha pesquisa.

EPÍGRAFE

“Amanhã há de ser outro dia.”
(Chico Buarque)

RESUMO

JULIANA DE OLIVEIRA RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE CONSERVANTES ANTIMICROBIANOS DE BASE NATURAL E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS

Orientador: Elcio Ribeiro Borges
Coorientador: Anita Ferreira do Valle

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O segmento de bebidas não alcoólicas tem uma importância global significativa, uma vez que a presença de diversos fornecedores internacionais configura um mercado altamente competitivo e em contínuo crescimento. O vasto aumento da priorização na ingestão de sucos e refrescos industrializados deve-se ao ritmo de vida acelerado da população atual, somado à praticidade de preparo e armazenagem. Além disso, a sociedade vem apresentando um perfil de consumo cada vez mais exigente e consciente, buscando pela ingestão de bebidas naturais que estejam em concordância com o regulamento da sustentabilidade. Portanto, é imprescindível que haja pesquisas que garantam uma maior qualidade higiênico-sanitária aos produtos industrializados, como por exemplo, o desenvolvimento de novos conservantes de base natural que possam ter um papel promotor na saúde do público consumidor. Os conservantes consistem em substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (Steen e Ashurst, 2006). O presente estudo tem como objetivo analisar os potenciais da biomassa de microalgas dos gêneros *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Haematococcus* e substâncias naturais como levulinato de cálcio e ácido P-anísico como conservantes naturais antimicrobianos e sua eficiência em refresco e néctar de laranja. As etapas que compõem a metodologia compreendem, de uma forma geral, dez passos importantes. A princípio foi feita uma seleção de diferentes cepas dos gêneros das microalgas supracitadas e das substâncias levulinato de cálcio e ácido p-anísico. Foram efetuados repiques das microalgas a fim de atingir o crescimento ideal das culturas para a obtenção da densidade celular e/ou de compostos bioativos. Em seguida, houve a seleção das bebidas. Posteriormente, foram obtidos meios de cultura de amplo espectro para crescimento de fungos e bactérias (BHI, Ágar Sangue e Sabouraud Dextrose Ágar). Logo após, sucedeu a semeadura das amostras de bebida e isolamento dos microrganismos que cresceram nas placas. Após o crescimento, os microrganismos foram identificados pela técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo

de voo (MALDI-TOF MS) e, baseado neste resultado, foram realizados testes de eficiência dos conservantes na inibição do crescimento microbiano. A partir da comparação dos resultados da formação de halos, foram escolhidos os conservantes com melhor desempenho e as suas melhores concentrações (*Spirulina maxima*, *Chlorella sp*, ácido levulínico e ácido p-anísico), visando definir o delineamento de uma combinação. Feita a matriz combinatória, foi realizada a preparação dos coquetéis de conservantes naturais; os mesmos receberam uma adição de néctares e refrescos de laranja e, posteriormente, foi feita a técnica de Filtração em Membrana. Por fim, foram realizadas análises, após 15 dias da produção dos néctares e refrescos, de cepas microbianas nas bebidas. Devido à relevância temática e diante dos resultados alcançados o presente trabalho pode representar um passo importante para o desenvolvimento de trabalhos futuros acerca do uso de conservantes naturais em bebidas.

Palavras-chave: conservantes naturais, microalgas, bebidas não alcoólicas, levulinato de cálcio e ácido p-anísico.

ABSTRACT

JULIANA DE OLIVEIRA RIBEIRO

**DEVELOPMENT OF NATURALLY-BASED ANTIMICROBIAL PRESERVATIVES
AND PERFORMANCE EVALUATION IN NON-ALCOHOLIC BEVERAGES**

**Leader: Elcio Ribeiro Borges
Co-leader: Anita Ferreira do Valle**

Abstract of the undergraduate thesis presented at the Paulo de Góes Institute of Microbiology of the Federal University of Rio de Janeiro, as part of the necessary requirements to obtain a Bachelor's degree in Biological Sciences: Microbiology and Immunology and approval in the RCS Course Completion Work.

The non-alcoholic beverage segment has significant global importance because the presence of several international suppliers constitutes a highly competitive and continuously growing market. The vast increase in prioritization in the intake of industrialized juices and refreshments is due to the frenetic pace of life of the current population, adding to the practicality of preparation and storage. In addition, society has become increasingly demanding and aware of the products they consume, seeking to consume natural beverages that comply with sustainability regulations. Therefore, it is essential that there are researches that guarantee a higher hygienic-sanitary quality to industrialized products, such as the development of new natural-based preservatives that may have a promoting role in the health of the consumer public. Preservatives are substances that prevent, or delay food alteration caused by microorganisms or enzymes (Steen and Ashurst, 2006). The present study aims to analyze the potential of microalgae biomass of the genera *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, and *Haematococcus* and natural substances such as calcium levulinate and p-anisic acid as natural antimicrobial preservatives and their efficiency in orange juice and nectar. The steps that make up the methodology generally include ten important steps. At first, was selected different strains of the microalgae as mentioned above and the substances calcium levulinate and p-anisic acid. Microalgae cultures were carried out to achieve the ideal growth of the cultures to obtain cell density and/or bioactive compounds. Then there was the selection of drinks. Subsequently, broad-spectrum culture media were obtained for the growth of fungi and bacteria (BHI, Blood Agar and Sabouraud Dextrose Agar). Soon after, the beverage samples were seeded and the microorganisms that grew on the plates were isolated. After growth, the microorganisms were identified in the matrix-assisted laser ionization/desorption technique coupled with time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and based on this result, microbial growth inhibition tests were performed. From the comparison of the results of the formation of halos, the preservatives with the best performance and their best concentrations were chosen (*Spirulina maxima*, *Chlorella* sp, levulinic acid, and p-anisic acid) occurred, aiming to define the design of a combination. Once the combinatorial matrix was made, the cocktails with natural preservatives were prepared; they received an addition of orange nectars and orange refreshments and, later, the Membrane Filtration technique was performed. Finally, there was

an analysis, after 15 days of the production of nectars and refreshments, of microbial strains in the beverages. Due to the thematic relevance and given the results achieved, the present work may represent an important step for the development of future works on the use of natural preservatives in beverages.

Keywords: natural preservatives, microalgae, non-alcoholic beverages, calcium levulinate and p-anisic acid

RESUMO PARA LEIGOS

JULIANA DE OLIVEIRA RIBEIRO

DESENVOLVIMENTO DE CONSERVANTES ANTIMICROBIANOS DE BASE NATURAL E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS

Orientador: Elcio Ribeiro Borges
Coorientador: Anita Ferreira do Valle

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes na Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Um dos maiores obstáculos enfrentados pela indústria de bebidas é a preservação dos seus produtos. Conservantes são substâncias que possuem o propósito de estender a vida útil do produto, impedindo a proliferação de microrganismos, tais como bactérias e fungos, e evitando modificações indesejáveis em sua composição. Entretanto, para grande parte da população, os conservantes são tipicamente vistos como nocivos, visto que são correlacionados à presença de química. Logo, tal cenário provocou a busca de empresas por alternativas mais sustentáveis para a conservação dos seus produtos. Dessa maneira, o Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF), da UFRJ, desenvolveu uma pesquisa acerca da capacidade de microalgas, ácido levulínico, levulinato de butila, levulinato de cálcio e ácido p-anísico terem propriedades conservantes naturais. Para tal, 10 passos foram empregados. Numa primeira etapa, foi feita a escolha de cinco espécies de microalgas e de substâncias tais como levulinatos e ácido p-anísico para verificar suas eficiências na inibição do crescimento de microrganismos em refresco e néctar de laranja. Foi feita uma análise para verificar e identificar os microrganismos ali presentes e, os conservantes foram testados contra esses microrganismos para ver se impedia o crescimento deles. A partir da resolução destes experimentos, foram escolhidos os melhores conservantes em testes, para assim serem testadas diferentes combinações das substâncias. Imediatamente após esses últimos passos, as bebidas foram passadas em filtros contendo membranas esterilizantes para posterior contagem dos microrganismos. Com base na contagem, foi analisado quais os coquetéis mais eficazes e foi realizado, após 15 dias, uma pesquisa de quais microrganismos estão presentes nas bebidas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Segmentos de bebidas.....	1
Figura 2: Cultivo de microalgas em sistemas abertos	17
Figura 3: Exemplos de cultivo de microalgas em sistemas fechados	18
Figura 4: Representação do método de difusão em disco de ágar	22
Figura 5: Estrutura química molecular do levulinato de cálcio	24
Figura 6: Estrutura química molecular do ácido P-anísico	25
Figura 7: Esquema ilustrativo gráfico representando a execução de um equipamento de MALDI-TOF durante o reconhecimento de microrganismos	32
Figura 8: Leitura e interpretação de um dos testes de determinação da sensibilidade (Antibiograma): método de difusão a partir de disco de ágar	33
Figura 9: Microscopia óptica de <i>Chlorella</i> sp com parede celular rompida	34
Figura 10: Fluxograma esquemático das etapas da Filtração por Membrana	36
Figura 11: Ilustração do frasco esterilizado utilizado no sistema de filtração	37
Figura 12: As 10 cepas de microrganismos escolhidas para serem levadas ao MALDI-TOF MS	39
Figura 13: As 10 cepas de microrganismos isolados e crescidos em meio líquido	40
Figura 14: Halos formados e ranqueamento em 3 tipos diferentes	41
Figura 15: Construção da matriz combinatória	45
Figura 16: Resultados mais satisfatórios na contagem de UFC/ml.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Padrão Microbiológico Sanitário para algumas bebidas não alcoólicas.....	4
Quadro 2: Classificação das DTAs, definição e seus respectivos agentes causadores..	6
Quadro 3: Os três tipos de conservantes empregados nos setores industriais de bebidas.	9
Quadro 4: Principais categorias de substâncias extraídas de microalgas e seus exemplos mais comuns.....	12
Quadro 5: Espécies de microalgas comercializáveis: principais produtores, aplicações e produção mundial em tonelada.....	13
Quadro 6: Cultivo de distintas espécies de microalgas e seus referentes regimes de cultivo.....	20
Quadro 7: Identificação de compostos de microalgas que apresentam atividades antibacterianas consideráveis	21
Quadro 8: Descrição da composição do meio Brain Heart Infusion (BHI), preparado em 1L de água deionizada com pH $7,4 \pm 0,2$ a 25°C	30
Quadro 9: Descrição da composição do meio Ágar Sabouraud Dextrose, preparado em 1L de água ultra purificada com pH $5,6 \pm 0,2$ a 25°C	30
Quadro 10: Descrição da composição do meio Ágar Sangue de carneiro, com pH $7,3 \pm 0,2$	31
Quadro 11: Bebidas preparadas para posterior adição dos coquetéis de conservantes.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação, através do MALDI-TOF MS, dos microrganismos presentes nas bebidas de laranja	38
Tabela 2: Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio BHI (parte 1).....	41
Tabela 3: Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio BHI (parte 2).....	42
Tabela 4: Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio ágar sangue (parte 1).....	42
Tabela 5: Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio ágar sangue (parte 2).....	43
Tabela 6: Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio BHI (parte 1).....	43
Tabela 7: Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio BHI (parte 2).....	44
Tabela 8: Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio (parte 1).....	44
Tabela 9: Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio ágar sangue (parte 2)	44
Tabela 10: Ranking dos microrganismos mais resistentes frente ao uso dos conservantes em teste e suas respectivas atuações.....	45
Tabela 11: Contagem de UFC/ml nas bebidas com conservantes industriais, nas bebidas sem conservantes, e nas bebidas com conservantes em teste	46
Tabela 12: Contagem de UFC/ml nas bebidas com conservantes em teste (coquetéis de refrescos e néctares).....	46
Tabela 13: Resultados mais satisfatórios na contagem de UFC/ml	47
Tabela 14: Microrganismos identificados no MALDI-TOF MS	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	hidroxianisol butilado
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro-Coração)
BHT	hidroxitolueno butilado
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CO ₂	Dióxido de carbono
DHA	ácido docosanyaenoico
DO	Densidade Óptica
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	ácido eicosapentaenoico
FAO-OMS	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Faostat	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
GRAS	Generally Recognized As Safe (Geralmente Reconhecido Como Seguro)
LEAF	Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIC	Concentração Mínima Inibitória
NASA	National Aeronautics and Space Administration
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBR	Fotobiorreator
PD	Projeto de Pesquisa
ppm	partes por milhão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TGI	Trato Gastrointestinal
TSA	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
UFC	Unidade Formadora de Colônia

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA LEIGOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Bebidas	1
1.1.1 Classificação dos sucos	3
1.1.2 Legislação vigente para controle microbiológico em bebidas não alcoólicas	3
1.1.3 Aditivos para bebidas não alcoólicas.....	4
1.1.4 Agentes microbianos comumente encontrados em contaminação de alimentos e bebidas.....	5
1.2 Conservantes	7
1.2.1 Propriedades físico-químicas e eficiência	8
1.2.2 Busca por novos conservantes naturais antimicrobianos	9
1.2.3 Considerações gerais	11
1.3 Microalgas	11
1.3.1 Funcionalidades das microalgas.....	13
1.3.2 Microalgas com aplicações na área de alimentos	15
1.3.3 Sistemas de cultivo de microalgas.....	17
1.3.4 Regimes de cultivo usados para a produção de biomassa microalgal	19
1.3.5 Atividade antibacteriana das microalgas	20
1.3.6 Atividade antifúngica das microalgas.....	23
1.4 Ácido Levulínico, Levulinato de Cálcio e Ácido P-anísico	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Seleção das cepas de microalgas com potencial antimicrobiano e outras substâncias	28
4.2 Seleção das bebidas	29
4.3 Seleção de grupos microbiológicos para semear as bebidas	29
4.4 Semeadura das amostras de bebida, isolamento e identificação dos microrganismos	31
4.5 Cultivo dos microrganismos isolados e testes de inibição do crescimento microbiano	32

4.6 Matriz de combinação entre agentes microbianos identificados	35
4.7 Produção dos coquetéis de conservantes naturais.....	35
4.8 Técnica de Inoculação por Plaqueamento – Filtração por Membrana	36
4.9 Acompanhamento de cepas microbianas nas bebidas	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Semeadura das amostras de bebida, isolamento e identificação dos microrganismos	38
5.2 Testes de inibição do crescimento microbiano.....	40
5.3 Matriz de combinação entre agentes microbianos identificados	45
5.4 Técnica de Inoculação por Plaqueamento – Filtração em membrana	46
5.5 Acompanhamento das cepas microbianas nas bebidas.....	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bebidas

Segundo a legislação Brasileira, Lei nº8.918 de 1994, o termo bebida consiste em um produto industrializado, destinado à ingestão humana, em estado líquido, destituído de finalidade medicamentosa ou terapêutica. As bebidas são comumente divididas em dois grupos: bebidas alcoólicas e bebidas não alcoólicas. Bebidas não alcoólicas classificam-se como bebidas refrescantes, alimentares, naturais e infusões. As bebidas refrescantes costumam ter na sua composição concentrações versáteis de suco de frutas, exemplificadas pelos refrigerantes. Bebidas alimentares possuem alto valor nutritivo de vitaminas e sais minerais. Bebidas naturais são representadas pela água, leite e suco de frutas. Por fim, as bebidas desenvolvidas a partir da técnica de infusão apresentam características organolépticas próprias, assim como grande importância econômica, como, por exemplo, o café (Lima e Melo Filho, 2011). O setor de bebidas é responsável pela geração de milhares de postos de trabalho, sendo relacionado diretamente ao progresso econômico e a novas referências de consumo. De acordo com o BNDES Setorial (Figura 1), a indústria de bebidas classifica-se em diferentes segmentos que podem ser agrupados da seguinte maneira:

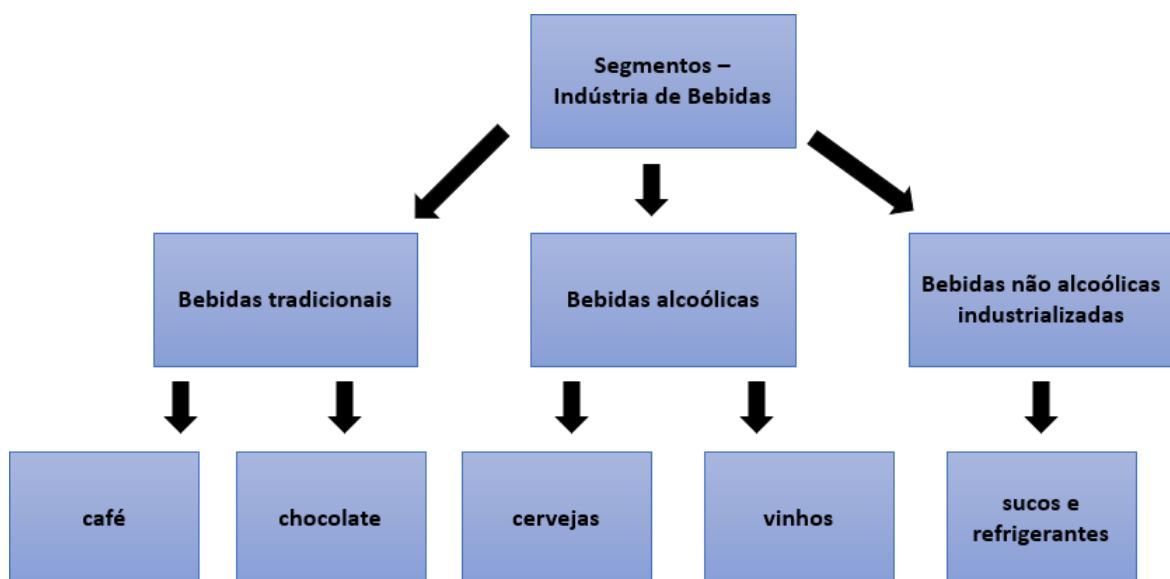


Figura 1 - Segmentos de bebidas.
Fonte: BNDES Setorial.

Ingerir bebidas é fundamental para a manutenção física dos indivíduos, devido às funções de reposição hídrica e eletrolítica, além de auxiliar na digestão e fornecimento de nutrientes essenciais. As bebidas podem satisfazer a sede, ajudar a afastar a fome e ajudam na

sensação de bem-estar do corpo e mente (Fellows e Hampton, 1992). Os tipos comuns de bebidas incluem leite, sucos, refrigerantes, chá, café e bebidas alcoólicas, como cervejas e vinhos. As bebidas mais comuns estão na forma de estimulantes, isto é, o chá e o café, sendo bebidas com baixas calorias que contêm antioxidantes e flavonoides, junto com muitos outros metabólitos biologicamente ativos que podem ser benéficos para a saúde. Por outro lado, os sucos de frutas contêm a maior parte dos nutrientes da própria matéria-prima. Entretanto, bebidas à base de frutas costumam ser ricas em calorias, portanto, não são recomendadas para o consumo diário, dependendo da quantidade calórica recomendada para consumo (Walker e Goran, 2015).

Conforme manifesto pelo BNDES Setorial (2006), existem cinco categorias que classificam os tipos de sucos para ingestão humana: I) sucos naturais; II) sucos concentrados; III) sucos em pó; IV) sucos de polpa; V) sucos prontos para beber. Os setores de sucos prontos para beber movimentam cerca de 250 milhões de litros/ano, entretanto, procuram cativar a predileção do público consumidor brasileiro que se recusa a ingerir sucos industrializados. Nesse sentido, essas indústrias buscam proporcionar alguma novidade atrativa e benéfica para competir com o mercado de outros segmentos. Já o mercado de suco concentrado, devido à facilidade de conservação e transporte dessa categoria é o principal segmento para exportação, tendo grande relevância no mercado global (BDNSES Setorial, Rio de Janeiro, 2006).

A cultura de citros é tida como uma atividade econômica extremamente importante no cenário mundial, em que o Brasil, China, Estados Unidos, México e alguns países europeus estão entre os maiores produtores. Alimentos cítricos, como a laranja, são largamente consumidos por países Europeus e Asiáticos, o que confere uma fonte essencial de divisas que colocam o Brasil como o maior exportador mundial de laranja e de seus subprodutos (Rissato *et al.*, 2021).

O suco de laranja é o mais popular do mundo, com 36,5% de participação entre os sucos, sendo consumido em diversos países de diferentes culturas e hábitos alimentares variados (Neves *et al.*, 2011). Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2018), foram concebidas 53,7 milhões de toneladas na safra 2016/17. Em 2017, o rendimento com as exportações de suco de laranja foi de US\$ 1,9 bilhão. O Brasil destaca-se como o líder mundial de produção e exportação de laranja, com aproximadamente 68% da produção e 79% das exportações mundiais (USDA, 2018).

1.1.1 Classificação dos sucos

O Art. 5º da Lei nº 8918 (Brasil, 1994) determina que “suco ou sumo é bebida não fermentada, não concentrada, e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo”. Conseguem ser estabilizados através de algum tipo de tratamento físico ou químico aprovado, ou compreender algum tipo de aditivo, que assegure a sua conservação (EMBRAPA/SEBRAE, 1997).

Néctar e refresco são nomenclaturas de bebidas consumidas no dia a dia da população, porém costumam ser generalizadas no termo suco. À vista disso, é fundamental esclarecer a diferença entre eles para que as pessoas saibam escolher, no momento da compra, qual a bebida que mais atende suas necessidades (Silva *et al.*, 2015).

O néctar é uma bebida não fermentada, é o suco preparado contendo fruta, açúcar e água, destinado ao consumo direto. De acordo com a Legislação Normativa N°12 de 04 de setembro de 2003, néctar equivale a 30 - 50% de concentração da fruta no suco. Isto significa que o restante pode ser constituído por corantes, adoçantes, conservantes ou outros aditivos, e é diluído em água (ABIR, 2016).

O refresco é uma bebida não fermentada, obtida pela diluição em água potável, do suco de fruta, polpa ou extrato vegetal de sua origem. De acordo com a legislação, pode ser preparado com ou sem adição de açúcares, podendo também ser gaseificado com dióxido de carbono (CO₂). Quando for introduzido dióxido de carbono, o refresco será nomeado como “refresco ou bebida de (nome da fruta) gaseificado”. Segundo o decreto N° 6.871, de 4 de junho de 2009 da Presidência da República, o refresco, quando açúcares forem incorporados, deverá ter a qualificação adoçado, acrescida à sua denominação. Quando houver duas ou mais frutas em sua composição será intitulado de “bebida mista” (Rocha *et al.*, 2020).

1.1.2 Legislação vigente para controle microbiológico em bebidas não alcoólicas

Sabe-se que a legislação é responsável por assegurar a qualidade dos produtos, verificando os processos, a execução e as vendas, impedindo, assim, que estabelecimentos atuem sem seus manuais de boas práticas de fabricação em excelência. A indústria brasileira é regulada por dois órgãos principais: o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A Anvisa fomenta a saúde da sociedade, tendo seu ofício, essencialmente, nos aditivos liberados, nos padrões microbiológicos e na rotulagem. O Mapa é incumbido pela padronização, registro e fiscalização de bebidas no Brasil, conforme competência atribuída pela Lei nº 8.918, de 14 de junho de 1994 (Brasil, 1994).

No Quadro 1 estão reunidos os parâmetros admitidos para determinadas bebidas não alcoólicas fundamentados na Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019 publicado pelo Ministério da Saúde/ANVISA no Diário Oficial da União, onde:

- a) n: número de unidades retiradas de um lote que serão analisadas independentemente.
- b) c: número máximo aceitável de unidades do lote em que as contagens microbianas estão acima do limite mínimo (m)
- c) m: limite mínimo tolerado para o microrganismo investigado
- d) M: limite máximo tolerado para o microrganismo investigado (unidades defeituosas).

Quadro 1 - Padrão Microbiológico Sanitário para algumas bebidas não alcoólicas (adaptado da Anvisa, 2019).

Padrão Microbiológico Sanitário						
Produto	Microrganismo	Tolerância para amostra INDICATIVA (UFC/ml)	Tolerância para amostra REPRESENTATIVA			
			n	c	m (UFC/ml)	M (UFC/ml)
Refrigerante e outras bebidas carbonatadas	Bolores e leveduras/mL, exceto bebidas fermentadas	Ausência	5	2	10	102
Suco desidratado	Enterobacteriaceae/g	102	5	2	10	102
	Salmonella/25mL	Ausência	5	0	Ausência	-
Suco concentrado	Salmonella/25g	Ausência	5	0	Ausência	-
	Enterobacteriaceae/mL	102	5	2	10	102
	Bolores e leveduras/mL	102	5	2	10	102
Refrescos, sucos, néctares e outras bebidas não carbonatadas, adicionadas de conservadores, não refrigeradas	Bolores e leveduras/mL	102	5	2	10	102

1.1.3 Aditivos para bebidas não alcoólicas

Os constituintes da bebida não alcoólica são divididos em duas categorias: substâncias alimentares (frutas, suco, açúcar e amidos) e aditivos (adoçantes e/ou conservantes). Os aditivos alimentares são estabelecidos pela Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 (Brasil, 1997b), como qualquer ingrediente introduzido aos alimentos, sem a finalidade de nutrir, com o

propósito de alterar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais. Uma série de testes toxicológicos são realizados nos aditivos alimentares a fim de certificar sua segurança e, ainda, nem todos os aditivos conseguem ser usados em qualquer tipo de bebida ou alimento.

A utilização de aditivos alimentares é proibida quando (Brasil, 1997b):

- I. não for seguro ao ser humano;
- II. interferir penosamente ao valor nutritivo do alimento;
- III. for usado para ocultar falhas no processamento, na matéria-prima ou nas técnicas de manipulação.

A dose empregada de aditivos não pode superar os valores de consumo diário preconizado e a utilização deve atender as condições de pureza definidas pelo Food Chemical Codex (FAO-OMS). Há diversos aditivos alimentares aplicados às bebidas não alcoólicas, dentre eles estão os acidulantes, antioxidantes, aromatizantes, conservantes, emulsificantes, espumantes, reguladores de acidez etc (Braga, 2019).

1.1.4 Agentes microbianos comumente encontrados em contaminação de alimentos e bebidas

Os microrganismos presentes nos alimentos, denominados como patogênicos, podem representar riscos à saúde do homem e de animais. Os microrganismos patogênicos chegam ao alimento através de diversas vias, sempre exprimindo precárias condições de higiene durante a produção, armazenamento, distribuição ou manuseio ao nível doméstico (JAY, J. M., 2005).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são todas as ocorrências clínicas decorrentes da ingestão de alimentos que podem estar contaminados com microrganismos patogênicos, substâncias químicas ou que possua na sua constituição estruturas naturalmente tóxicas (Germano, 2011). No Quadro 2 são apresentadas as classificações das DTAs.

Quadro 2 – Classificação das DTAs, definição e seus respectivos agentes causadores.

Classificação de DTAs	Definição	Principais agentes
Intoxicação	Ingestão de toxina pré-formada produzida pelo microrganismo patogênico devido à sua multiplicação no alimento	<i>Staphylococcus aureus</i> , fungos produtores de micotoxinas, <i>Clostridium botulinum</i>
Toxinfecção	Ingestão da toxina produzida no trato gastrintestinal	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i>
Infecção	Ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos (bactérias, vírus ou parasitos) que se reproduzem no organismo com ou sem agressão ao epitélio	<i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Salmonella</i> sp.

Bacillus cereus, por exemplo, é um microrganismo facultativamente aeróbico, gram-positivo, formador de esporos e produtor de dois tipos de toxina – diarreia (termo-lábil) e emética (termo-estável). A síndrome emética é gerada pelas células em crescimento no alimento e, se manifesta como náuseas e vômitos dentro de 1 a 5h após o consumo de alimentos contaminados. Na síndrome diarreica a intoxicação alimentar é causada pela presença de enterotoxinas complexas. Essas toxinas são produzidas durante o crescimento vegetativo de *B. cereus* no intestino delgado, onde os indivíduos contaminados apresentam como sintomas: dores abdominais, náuseas, vômitos e diarreia aquosa profusa. Em ambos os casos, os sintomas duram geralmente menos de 48h (ICMSF, 1996).

Já ao se referir a leveduras, os principais gêneros identificação da indústria de bebidas não alcoólicas são: *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Trichosporon* e *Zygosacharomyces*. São capazes de esporular e formar biofilmes, impedindo a remoção com o uso de alguns sanitizantes. Em indústrias produtoras de suco de laranja, fungos podem ser encontrados durante todo o processo de fabricação, como, por exemplo, *Candida intermedia* (Neoprospecta, 2021). As características de degradação nos produtos tornam-se evidentes muito tempo após a produção, uma vez que o crescimento de fungos é considerado lento. Ainda de acordo com

Neoprospecta (2021), esses microrganismos apresentam elevada resistência aos conservantes comumente utilizados nas indústrias de alimentos e bebidas: ácido sóblico e ácido benzoico. Portanto, há a necessidade de controles de qualidade alternativos a estes microrganismos para que não haja mais perdas de qualidade no produto.

1.2 Conservantes

Fatores como pH, teor de vitaminas, embalagem e condições de armazenamento podem influenciar a escolha do aditivo. Para minimizar danos, como a degradação das características nutricionais e frescas das bebidas de frutas, recomendam-se temperaturas de refrigeração durante o armazenamento e transporte (Aganovic *et al.*, 2016; Chueca *et al.*, 2016; Petruzzi *et al.*, 2017). As principais propriedades dos conservantes baseiam-se em retardar ou reduzir o crescimento de microrganismos, em não acometer a textura ou o sabor dos alimentos, em serem seguros para consumo humano e em estender a vida de prateleira. O prazo de validade é determinado pelas taxas específicas de crescimento dos microrganismos deteriorantes e pela degradação química dos componentes presentes nos alimentos (Akinwande *et al.*, 2012).

Embora a estabilidade de bebidas e sucos de frutas seja obtida por processamento térmico, tal procedimento tende a reduzir a qualidade e o frescor do produto. Portanto, os conservantes são uma boa opção, pois apresentam diversas vantagens, como retenção de qualidades sensoriais e valores nutricionais. A escolha de conservantes deve levar em consideração os requisitos específicos do produto, os tipos de organismos deteriorantes associados a ele, o pH do produto e o prazo de validade pretendido (POLÔNIO, Maria; PERES, Frederico, 2009).

Conservantes convencionais são substâncias químicas que impedem o crescimento e ação dos microrganismos e ajudam na manutenção temporal da qualidade dos alimentos sem afetar suas características naturais e incluem agentes antimicrobianos e antioxidantes. Os primeiros são usados para prevenir ou inibir a deterioração causada por fungos e bactérias (Dhaka *et al.*, 2016). Alguns são benzoatos, nitritos, propionato de cálcio e sorbatos. Já os antioxidantes são utilizados para prevenir a oxidação causada nos alimentos, como o hidroxitolueno butilado (BHT), o hidroxianisol butilado (BHA), o formaldeído, e alguns ácidos orgânicos (Seetaramaiah *et al.*, 2011).

Devido ao fato de as bebidas não alcoólicas serem ricas em vitaminas e minerais, fornecem um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos. Além disso, presença da água como veículo potencial de contaminação também é um fator importante que

mostra uma influência significativa na atividade microbiana. Nestes termos, a adição de conservantes ajudam a inibir o crescimento de microrganismos.

1.2.1 Propriedades físico-químicas e eficiência

O tipo de conservante que pode ser usado na bebida depende das propriedades físico-químicas do conservante e da bebida. Além disso, o pH, a presença de vitaminas, o tipo de embalagem e as condições de armazenamento são outros parâmetros que determinam se os conservantes seriam necessários e qual tipo deve ser usado para evitar a contaminação, o crescimento e multiplicação de microrganismos (Tfouni e Toledo, 2002; Jankulovska et al., 2016).

Segundo Silva *et. al* (2019), os conservantes devem seguir determinadas diretrizes, tais quais:

- I. não deve originar reações de hipersensibilidade no consumidor;
- II. não deve se decompor em substâncias tóxicas após o consumo;
- III. deve ser quimicamente estável (não alterar pH e tonicidade);
- IV. deve ser de fácil identificação e quantificação.

Algumas pesquisas já reportaram que a vida útil de refrigerantes à base de frutas sem qualquer conservante gira em torno de dois dias, devido ao alto teor de açúcar e às condições de acidez favoráveis para o crescimento de leveduras e bolores. De acordo com Shahnawaz et al. (2013), foi observado que o aquecimento das bebidas de frutas a 90°C aumentou sua vida de prateleira por alguns dias, mas resultou em perdas de cor e qualidade nutricional da bebida. Portanto, conservantes convencionais são comumente utilizados, em que compostos bacteriostáticos ou fungistáticos pertencentes ao grupo dos ácidos fracos, como os ácidos benzoico e sórbico, estão presentes em conservantes comumente utilizados em produtos comercialmente disponíveis. Ainda segundo Santos (2000), a eficácia desses agentes depende de vários fatores, incluindo o pH do produto, a temperatura, a estocagem, a carga microbiana e a resistência intrínseca dos microrganismos presentes após a embalagem, além da presença de tensoativos e agentes umectantes, que podem afetar a concentração inicial do conservante. Embora os conservantes possam ser utilizados com sucesso em formulações de bebidas, não podem ser considerados infalíveis e não há um substituto para controles severos de qualidade e higiene em todos os estágios de fabricação (Steen e Ashurst, 2006).

Os conservantes são a classe mais importante de aditivos para bebidas e podem ser classificados em classes I e II (Seetaramaiah *et al.*, 2011). A Classe I compreende os

conservantes naturais (sal, açúcar, vinagre, por exemplo) e a classe II engloba os conservantes sintéticos ou químicos (benzoatos, sorbatos, glutamatos, por exemplo). Nas indústrias, há três tipos de conservantes usados em bebidas (Quadro 3): agentes antimicrobianos, agentes antioxidantes e agentes anti-endurecimento (Denyer *et al.*, 2008; Kulkarni *et al.*, 2010; Russell, 1999; Block, 2001).

Quadro 3 – Os três tipos de conservantes empregados nos setores industriais de bebidas.

Tipos de conservantes industriais	Modo de ação
Agentes antimicrobianos	inibem o crescimento de microrganismos
Agentes antioxidantes	previnem a oxidação de vitaminas, minerais e lipídeos dos alimentos cessam a degradação das gorduras e óleos, resultando em ranço
Agentes anti-endurecimento	evitam o escurecimento enzimático e não enzimático

Os métodos tradicionais para conservar bebidas são: preservação com cloreto de sódio, açúcares, álcool etílico, óleos, vinagre e outros conservantes químicos (ácido sórbico, por exemplo) usados tradicionalmente; branqueamento; desidratação e secagem; além de liofilização. Sulfitos e dióxido de enxofre são usados para impedir o desenvolvimento de leveduras e bactérias. De acordo com PEREIRA (2011b), o ácido benzóico é o conservante mais amplamente usado para bebidas ácidas e funciona como agente antifúngico em preparações tópicas. Além disso, a atividade dos ácidos sórbicos aumenta com a diminuição do pH do produto, dificultando o desenvolvimento de leveduras e bolores. Entretanto, algumas espécies de fungos (*Penicillium spinulosum* e *Aspergillus niger*) são resistentes a conservantes químicos, como o ácido sórbico e o ácido benzóico, e podem tolerar ambientes ácidos mesmo em baixas temperaturas e valores relativamente baixos de atividade da água (Glevitzky *et al.*, 2009).

1.2.2 Busca por novos conservantes naturais antimicrobianos

Antes do advento dos conservantes, os alimentos eram mantidos em recipientes como argila para aumentar sua vida útil. Açúcar e sal são alguns dos primeiros conservantes, cuja

adição em alimentos resulta em ambientes com alta pressão osmótica, privando o meio aquoso necessário para que as bactérias vivam e se reproduzam. Abordagens gerais de preservação destinadas a estender a vida útil incluem remoção de água, controle de temperatura, secagem, congelamento, controle de pH, embalagem a vácuo, irradiação, embalagem asséptica, embalagem em atmosfera modificada, aquecimento (pasteurização e esterilização), fermentação e adição de conservantes químicos (Gould, 2000). Em contrapartida, as técnicas à disposição fundamentam-se na utilização de métodos que se comprometem com a qualidade do produto, sem aditivos, com valor nutritivo e assegurado microbiologicamente (Ranken et al., 2005; Glevitzky et al., 2009).

A indústria de bebidas tem usado antimicrobianos para evitar perdas de qualidade, o que significa que as propriedades sensoriais do produto não são afetadas durante o processamento, aquisição, armazenamento e consumo. Quando são adicionados conservantes em refrigerantes de frutas, as características físicas, químicas, organolépticas e nutricionais devem ser mantidas sem que o aditivo tenha efeito adverso. Os principais antimicrobianos usados pela indústria de bebidas, com o objetivo de preservar a qualidade de seus produtos, são os sorbatos e os benzoatos. No entanto, suas aplicações devem ser feitas de maneira cuidadosa para evitar que a presença deles possa afetar as propriedades sensoriais do produto. Um exemplo é o benzoato de sódio que, em baixos valores de pH, pode conferir um leve sabor picante atribuível ao ácido benzóico não dissociado. Se este efeito for indesejável, pode ser superado usando outros conservantes aprovados em conjunto com benzoato de sódio para diminuir sua concentração em níveis considerados abaixo do limiar de sabor (CAO et al., 2007).

Tem sido cada vez maior a exigência por produtos com rótulos categorizados como mais “verdes”, “naturais” ou “limpos”. Ou seja, há um maior incentivo na busca por alternativas consideradas mais adequadas no uso de conservantes mais apropriados para atender a demanda de um nicho de consumidor mais exigente quanto à natureza dos produtos. Os conservantes naturais são considerados novos conservantes uma vez que tem sido proposto para ser utilizado em refrigerantes e bebidas de frutas. A maioria deles está em pesquisa e poucos estão satisfazendo as características desejáveis para um conservante de alimentos. Sendo assim, um novo conservante deve ser eficaz contra um amplo espectro de microrganismos, ser estável em baixos valores de pH, com boa solubilidade aquosa, de origem natural, barato, e fácil de manusear (Mani-López et.al, 2019).

1.2.3 Considerações gerais

É lícito concluir que o “novo conservante ideal” ainda não existe, apesar das boas e interessantes propostas relatadas na literatura. Pesquisas acerca de conservantes naturais têm sido feitas devido aos efeitos nocivos associados aos conservantes químicos. Dados da Mintel mostram que a porcentagem de lançamento de novos produtos com sabores naturais na indústria global de alimentos passou de 35% em 2008 para 39% em 2012. Por outro lado, a participação de sabores artificiais diminuiu de 65% para 61% (Thomas, 2014). Substâncias extraídas de plantas tendem a ser boas no controle do crescimento microbiano devido à sua variedade química (Negi, 2012). Outros isolados, de origem natural, são os óleos essenciais de plantas ricas em terpenos que possuem propriedades antimicrobianas substanciais. Os óleos essenciais provenientes de especiarias e ervas geralmente são considerados como seguros (Geralmente Reconhecido como Seguro, em inglês, Generally Recognized as Safe, GRAS) e têm propriedades antimicrobianas.

Alguns exemplos de conservantes naturais usados em indústrias alimentícias são: sorbato de potássio, nitritos de sódio/potássio, ácido láctico e vitamina C. O sorbato de potássio, devido ao seu caráter ácido, apresenta ação antibacteriana e antifúngica. Os nitritos de sódio/potássio são inseridos em alimentos à base de carne, sendo empregados na mistura denominada “sal de cura”, assim como também em uma mistura com cloreto de sódio. O ácido láctico tem ação inibidora para certos microrganismos patogênicos, uma vez que aumenta o tempo de latência dos microrganismos e/ou reduz sua taxa de crescimento. A vitamina C age dificultando a oxidação dos alimentos e é bastante utilizado como uma alternativa para impedir o escurecimento de frutas, visto que gera a redução de quinonas para a forma fenólica (GOMES, GABRIEL, 2006).

Concernentemente com o exposto, no presente estudo, serão analisados os efeitos potenciais de componentes de microalgas, do ácido levulínico, do levulinato de butila, do levulinato de cálcio e do ácido P-anísico como possíveis conservantes naturais antimicrobianos.

1.3 Microalgas

Microalgas são microrganismos que possuem crescimento acelerado e alguns fatores são imprescindíveis para a viabilidade do seu cultivo, tais como temperatura, pH, intensidade da luz e fonte de nutrientes (principalmente carbono e alguns sais). A grande maioria das espécies de microalgas realiza a fotossíntese por meio da energia luminosa para sua manutenção, desenvolvimento e reprodução celular, através da fixação do carbono, causando o

aumento da sua biomassa (Gladue, 1991). Microalgas estão presentes em corpos aquáticos em todo o globo terrestre, podendo estar localizadas em água doce, em meio marinho e, também, em folhas e caules de vegetais. Este grupo de organismos permite a vida dos seres vivos aeróbicos sobre a superfície da Terra, uma vez que participa da produção da maior parte de oxigênio da atmosfera (CHISTI, 2004).

Alguns países têm investido na produção de microalgas em escala comercial. Este aumento no interesse global em elaborar pesquisas sobre o desenvolvimento de microalgas se deve pela relevância destes microrganismos como novas fontes naturais de metabólitos bioativos (vitaminas, polissacarídeos, carotenóides, entre outros), visto que possuem o potencial de produzir tais metabólitos em cultura, possibilitando a biossíntese de moléculas complexas, difíceis ou impossíveis de produzir por síntese química (Quadro 4). A extração de compostos com atividades antitumoral, antibacteriana, antivírica, antifúngica, por exemplo, é possível graças às propriedades naturais das algas, compostos estes complexos de serem sintetizados, possibilitando assim maior eficiência no desenvolvimento de fármacos. Perante o exposto, extratos de algas estão presentes em diversos cosméticos no mercado, produtos estes voltados para o tratamento cutâneo e para a proteção solar (Fonseca, 2016).

Quadro 4 - Principais categorias de substâncias extraídas de microalgas e seus exemplos mais comuns
(Adaptada de PRIYADARSHANI & RATH, 2012).

SUBSTÂNCIAS	EXEMPLOS
Pigmentos/Carotenoides	β -caroteno, astaxantina, clorofila, ficocianina
Ácidos graxos poliinsaturados	DHA (C22:6), EPA (C20:5), GAL (C18:3)
Vitaminas	A, B1, B6, B12, C, E, ácido fólico
Antioxidantes	catalases, polifenóis, superóxido
Outros	Antimicrobianos, antifúngicos, agentes antivirais, toxinas

O cultivo de microalgas é desenvolvido para diferentes finalidades (Quadro 5), tais como: abastecimento de microalgas vivas como comida para organismos aquáticos, utilização da biomassa como suplemento alimentar humano, como aditivo nutricional em rações animais, como fonte de ácidos graxos, proteínas e demais compostos bioativos e, como matéria-prima para a geração de biocombustíveis, biopolímeros e biofertilizantes (PRIMO et al., 2015). Além do uso de forma nutricional, a utilização da biomassa de microalgas nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia são as mais sólidas considerando o maior valor agregado detectado nestes setores. Dentre as microalgas cultivadas mundialmente e amplamente distribuídas como suplemento alimentar, a microalga do gênero *Chlorella* apresenta destaque no mercado devido ao seu notável valor nutricional. No Brasil, ainda não há cultivo comercial deste microrganismo, sendo a matéria-prima importada, principalmente de países da Ásia.

Quadro 5 – Espécies de microalgas comercializáveis: principais produtores, aplicações e produção mundial em tonelada.

MICROALGA	PRINCIPAIS PRODUTORES	PRODUTOS	PRODUÇÃO MUNDIAL (t/ano)
<i>Spirulina</i> (<i>Arthrosphira</i>)	Hainan Simai Pharmacy Co. (China) Earthrise Nutritionals (Califórnia, EUA) CyanotechCorp. (Havaí, EUA) Myanmar Spirulina factory (Myanmar)	pós, extratos tabletes, pós, extratos tabletes, pós, bebidas massa, salgadinhos	3.000
<i>Chlorella</i>	Taiwan Chlorella Manufacturing Co. (Taiwan) Klotze (Alemanha)	tabletes, pós, néctar macarrões pós	2.000
<i>Dunaliella salina</i>	Blue Green Foods (EUA) Vision (EUA)	pós β -caroteno	1.200

1.3.1 Funcionalidades das microalgas

O número aproximado de espécies de microalgas conhecidas é de cerca de dez milhões (BARSANTI e GUALTIERI, 2006). Microalgas são potenciais agentes biorremediadores de efluentes e são capazes de possibilitar geração de energia pelo aproveitamento de sua biomassa e óleo. O custo de produção das microalgas está associado principalmente ao meio de cultivo e aproveitamento da biomassa. O cultivo de microalgas em resíduos líquidos de processos de agroindústrias, os efluentes, pode originar matéria-prima renovável para biocombustíveis, rações, cosméticos e vários outros produtos (ORTENZIO, *et. al.*, 2015).

As microalgas se reproduzem de forma acelerada e com isso produzem enormes quantidades de óleo e biomassa em um curto período. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), é possível que a produtividade seja de dez a 100 vezes maior do que os cultivos agrícolas tradicionais. Isso chamou a atenção de setores que precisam de quantidades enormes de matéria-prima, como o de biocombustíveis. Paralelamente, as microalgas também se destacam em indústrias de cosméticos e de suplementos alimentares, que pagam valores exorbitantes por matérias-primas com propriedades raras. Isto acontece devido aos óleos produzidos por certas espécies que contêm compostos bastante valiosos como, por exemplo, ômega 3 e carotenóides (DERNER, 2006).

O metabolismo da microalga pode ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. No autotrófico, as funções são coordenadas pela fotossíntese. No heterotrófico, nutrientes são concedidos para que o metabolismo aconteça na ausência de luz. E por último, no cultivo mixotrófico desenrola-se a execução de ambos os metabolismos citados anteriormente (MORAIS, 2008).

As microalgas têm metabólitos de valor agregado, além dos lipídeos, tais quais: carboidratos, proteínas e pigmentos que podem ser refinados e comercializados com distintas utilidades (LAMMENS et al., 2012). *Chlorella* sp e *Spirulina maxima* são duas das principais espécies de microalgas cultivadas mundialmente, sendo aplicadas com o propósito principal de suplementação alimentar; a *Dunaliella salina*, é ótima fonte de caroteno e a *Haematococcus pluvialis* é cultivada visando a produção de astaxantina (AZEREDO, 2012).

Os carboidratos constituem-se como um dos compostos das microalgas com maior relevância (YEN et al., 2013). Tais compostos exibem diversas aplicações nas indústrias alimentícias, cosméticas, têxteis, lubrificantes, entre outras (ARAD e LEVY-ONTMAN, 2010). Já os lipídeos, acumulados pelas microalgas, são classificados conforme o número de carbono. Ácidos graxos com cadeia de 14-20 carbonos são usados na geração do biodiesel, ao passo que aqueles com cadeias maiores são utilizados como suplementos alimentares, como, por exemplo, o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosáexaenoico (DHA) (YEN et al., 2013).

A estrutura unicelular das microalgas viabiliza que elas transformem facilmente a energia solar em energia química. Essa conversão bioquímica tem sido destinada para a obtenção de biomassa de microalgas, por conseguinte, de produtos de finalidade comercial. As lagoas aeradas abertas e os fotobiorreatores fechados são as técnicas de cultivo de microalgas mais aplicadas (Brennan & Owende 2010, Harun et al. 2010, Chen et al. 2011, Singh et al. 2011), e a utilização de uma ou outra técnica de cultivo é impactada pelas características do ambiente de cultivo, pela espécie escolhida, a quantidade de luz fundamental e o processo de recuperação da biomassa do meio de cultura (centrifugação, floculação e filtração) que se planeja empregar. Portanto, no que se refere ao campo da biotecnologia, as microalgas têm sido desenvolvidas para diferentes aplicações comerciais, em bens de consumo e serviço consolidados bem como em tecnologias emergentes e portadoras de futuro.

A composição das microalgas está associada à natureza de cada espécie, além de fatores ambientais associados ao ambiente onde o cultivo está ocorrendo e ao meio de cultura usado (Miao & Wu 2006, Zamalloa et al. 2011). De acordo com uma pesquisa realizada por Xu et al. (2006), células da microalga *Chlorella protothecoides* possuem a sua composição bioquímica diferenciada quando cultivada de maneira autotrófica e heterotrófica. Em vista disso, por causa dessa diversidade de produtos presentes em biomassa de microalga, é usada pelo homem para a produção de suplementos alimentares, obtenção de fármacos e geração de biocombustíveis (Borowitzka 1999, Venkatesan et al. 2006).

1.3.2 Microalgas com aplicações na área de alimentos

Microalgas costumavam ser usadas, por humanos, como alimento e medicamento. As únicas microalgas usadas pelo homem, registradas historicamente antes de 1900, são as cianobactérias dos gêneros *Nostoc* e *Arthospira*. Espécies do gênero *Nostoc* são consumidas em países como a China, Tailândia e Peru, no entanto, nem todas as espécies ou cepas de *Nostoc* podem ser consumidas com segurança, visto que já foi comprovada a produção de metabólitos citotóxicos por parte da *Nostoc insulare*, por exemplo (Volk e Mundt, 2007). No passado, a cianobactéria filamentosa *Arthospira* era chamada de *Spirulina*, porém, todas as espécies comestíveis são membros do gênero *Arthospira* (Castenholz, 1989; Vonshak e Tomaselli, 2000). Antigamente, era usada como preparo de molho em refeições e atualmente, algumas espécies desse gênero fazem parte da composição de suplementos dietéticos, comercializados como *Spirulina* (Liang, 2004).

Já a microalga *Chlorella* é um gênero que contempla algas verdes de água doce, do filo Chlorophyta e classe Trebouxiophyceae, fácil de ser cultivada. Foi a primeira microalga cultivada em grande escala para ser comercializada como alimento natural. Estudos feitos por Mitsuda e Takehiko (1960) e Mitsuda et al. (1977) demonstraram que a parede celular da *Chlorella* precisa ser quebrada para tornar o conteúdo celular acessível e digerível. A causa do relato de eventos de diarreia e perda de peso devido à doses elevadas (até 500g) de *Chlorella* em pó (Powell et al., 1961) pode ser atribuída, principalmente, ao fato de que as células estavam intactas e, portanto, tinham pouco ou nenhum valor nutricional. Por outro lado, *Chlorella* apresenta alguns efeitos benéficos como o aumento do sistema imunológico e melhora da colite ulcerosa (Merchant et al., 1990; Merchant e Andre, 2001; Halperin et al., 2003; Ramos et al., 2010).

As cianobactérias do gênero *Arthospira* (*Spirulina*) são consideradas seguras para o consumo humano. De acordo com Belay et al. (1993), *Arthospira* pode ser usada como suplemento alimentar humano e animal, na indústria de medicamentos e de cosméticos, por exemplo, pois possui um alto teor de proteína (60% -70% do peso seco, dependendo das condições de cultura) e é uma fonte rica em vitaminas, especialmente vitamina B12 e pró-vitamina A (β -caroteno), minerais, especialmente ferro, e aminoácidos (MIRA, 2015; SANTOS et al., 2017). A comercialização dessa cianobactéria é feita, principalmente, na forma de pó e comprimidos e pode ser adicionada a uma variedade de alimentos.

No que diz respeito, a *Spirulina* apresenta também corantes naturais tais como ficocianinas, carotenoides e clorofila, os quais possuem enorme potencial de aplicações em

diversas indústrias. Do ponto de vista dos aspectos bioativos, o consumo de Spirulina eleva a digestibilidade, além de apresentar finalidades terapêuticas e ser fonte natural de nutrientes essenciais (MORAES; MIRANDA & COSTA, 2006). A Spirulina em pó comercializada na forma de comprimidos pode ser consumida por todas as faixas etárias de consumidores, até mesmo para a alimentação de pacientes para os quais é difícil mastigar ou engolir alimentos (ADIBA, 2011).

Estudos feitos por Karkos et al. (2011) exibem que a Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço, a NASA (National Aeronautics and Space Administration), tem empregado a Spirulina como complemento alimentar para os astronautas em missão espacial, devido à capacidade desta microalga de modular o sistema imunológico e de reduzir as inflamações celulares, em virtude de seu papel na redução de deficiências nutricionais. A ficocianina, pigmento presente em cerca de 14% do peso total da Spirulina, é responsável por estimular o sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos (HENRIKSON, 1994).

A Spirulina, por não ter paredes celulósicas e uma cobertura frágil de mucopolissacarídeos brandos, apresentam proteínas com boa digestibilidade, aproximadamente 83 a 90% quando sujeita à secagem simples, sendo os nutrientes preservados (MORAES, MIRANDA & COSTA 2006; MACHADO et al., 2017).

Apesar de haver um pequeno número de espécies de microalgas disponíveis sendo usadas como suplementos nutricionais e nutracêuticos, há muitas alegações sendo feitas quanto aos benefícios de microalgas e extratos de microalgas para a saúde. Entretanto, é necessário que haja o cultivo de microalgas para avaliar seu potencial para aplicações na saúde humana. Estudos científicos e médicos rigorosos são imprescindíveis para que as microalgas se tornem amplamente aceitas. A qualidade e segurança de microalgas e produtos de microalgas só são garantidas se forem produzidos por produtores confiáveis e credenciados (Grobbelaar, 2003; Belay, 2008; Gellenbeck, 2012). Muitas espécies deste grupo precisam ser exploradas e testadas, uma vez que há uma ampla produção de moléculas bioativas por essa diversidade de microalgas.

Há um conhecimento de cerca de 4000 espécies de microalgas, todavia, as principais cultivadas são as dos gêneros *Chlorella* e *Arthrosphaera* (*Spirulina*) para a introdução em alimentos naturais, *Dunaliella salina* para a obtenção de b-caroteno, e *Haematococcus pluvialis* para a obtenção de astaxantina. Microalgas do gênero *Arthrosphaera* têm sua relevância na adição alimentar em função de suas elevadas concentrações de proteína e da presença de compostos com propriedades de uso farmacêutico, como ácido linoleico e polissacarídeos (Becker, 2004).

1.3.3 Sistemas de cultivo de microalgas

As microalgas podem ser cultivadas de diferentes formas, que são divididas basicamente em dois grandes grupos: cultivos abertos e fechados. Os sistemas abertos podem ser divididos em águas naturais (lagos e lagoas) e lagos artificiais. Já os cultivos fechados são conhecidos como fotobiorreatores.

Os cultivos abertos (Figura 2) são os que mais representam o habitat natural das microalgas e consistem em tanques entre 15 e 20 cm de profundidade com pás que viabilizam a aeração do cultivo (PULZ, 2001). Os tanques abertos devem ter pouca profundidade para assegurar a iluminação uniforme do cultivo e maior produtividade em biomassa (Borowitzka, 1999).

Em sistemas abertos, parte da cultura encontra-se em contato com o ar atmosférico. Tais culturas desenvolvem-se em tanques, tanto em espaço aberto (*outdoor* ou exterior), quanto em espaços fechados (*indoor* ou interior), e, também, há um reduzido ou nenhum controle dos fatores ambientais (pH, temperatura, luz etc.), ou seja, crescem sob condições naturais.



Figura 2 – Cultivo de microalgas em sistemas abertos. A primeira imagem representa o centro de pesquisa de microalgas nos Estados Unidos. A segunda imagem mostra a Fazenda no Sul de Taiwan, que utiliza microalgas para produção de alimentos orgânicos

Fonte: Google Imagens, 2017.

Embora os sistemas abertos sejam fáceis de operar, possuem limitações, como por exemplo a limitada biomassa obtida ($0,05\text{--}0,5 \text{ g.L}^{-1}$), perdas por evaporação e difusão de CO_2 . Nos cultivos em espaço externo, há uma maior suscetibilidade a contaminações por bactérias, fungos, insetos, e, até mesmo por outras algas. Esses cultivos em tanques são concebidos para a aquisição de produtos de menor valor, exemplificado pelo ganho de biomassa para geração de biocombustíveis. Além disso, é preciso que haja enormes áreas inundadas para que ocorra um crescimento significativo de microalgas, visto que os tanques não podem apresentar grandes profundidades, pois dificulta a incidência luminosa (PULZ, 2001).

Já os sistemas fechados (Figura 3), conhecidos como Fotobiorreatores (“PBR”), possuem culturas que se desenvolvem com o objetivo de conseguir biomassas elevadas e redução do impacto ambiental ocasionado pela eutrofização. O uso de áreas reduzidas e terras inapropriadas para qualquer outro tipo de cultura, através da utilização de fotobiorreatores compactos, configura-se como um outro benefício desse tipo de sistema, permitindo assim longos períodos de cultivo contínuos e resultando em alta produtividade celular (Chisti, 2004).

Os tipos mais comuns de fotobiorreatores são os painéis verticais ou horizontais de forma achatada, os cilindros verticais, e os tubulares, fabricados com tubos de vidro, plástico ou policarbonato. Nos fotobiorreatores, as culturas conseguem ser supervisionadas, e, dessa forma, promove o controle das condições de cultivo, tais como densidade celular ou biomassa, temperatura, pH, concentração de nutrientes, e o controle das condições hidrostáticas (fluxo de ar e água, por exemplo), e redução de contaminações (PULZ, 2001).



Figura 3 – Exemplos de cultivo de microalgas em sistemas fechados. (A) Painéis de placas planas de acrílico na Universidade Estadual do Arizona (EUA). (B) Sacos plásticos transparentes na Alemanha. (C) Tubos horizontais na Austrália. (D) Tubos verticais na Holanda.

Fonte: Google Imagens, 2017.

Por outro lado, apesar de possibilitar inúmeros benefícios, os fotobiorreatores apresentam custos exorbitantes (preço estimado de R\$400.000,00) de implantação e execução, e, por conta disso, aplicam-se como matéria-prima para as indústrias alimentícias e cosméticas (Aquaculture Brasil, 2017). Além disso, o cultivo em fotobiorreatores está suscetível a superaquecimento do meio de cultivo por causa da proximidade da fonte de luz artificial, assim como do acúmulo de material biológico e oxigênio (Mata, 2010).

Em ambos os sistemas, a execução de diversos métodos de cultivo pode ser conduzida mediante diferentes concepções, quais sejam: Estacionário, semicontínuo ou contínuo. No método estacionário, pode-se encher um recipiente (cilindro, tanque etc.) com água tratada, e depois, adicionam-se os nutrientes e é feita a inoculação. Posteriormente, não é feito um manejo da cultura, as microalgas se multiplicam e podem ser manipuladas, por exemplo, na alimentação de organismos de aquicultura (Dias, 2017).

Segundo o Aquaculture Brasil (2018), no Cultivo em Modo de Operação Contínuo a cultura é diluída perpetuamente, isto é, ao longo das 24 horas do dia o volume é retirado. Já no Cultivo conduzido no Modelo Semicontínuo, somente uma parte do volume é retirada e em seguida o mesmo volume é reposto com meio de cultura (água + nutrientes) para que as células sigam com suas divisões mitóticas, e, dependendo da divisão celular, as diluições são repetidas em períodos regulares. Em ambos os métodos não há um tempo pré-definido para o encerramento do cultivo, só há interrupção do mesmo na condição de acontecer contaminação biológica. Nos dois métodos o volume da cultura pode ser inserido em outros recipientes para que se inicie culturas originais ou pode ser usado para alimentar os organismos cultivados (Aquaculture Brasil, 2018).

Existe uma menor possibilidade de se ter contaminação microbiana nos Cultivos Contínuo e Semicontínuos, pois há uma inibição do crescimento de microrganismos com a alta densidade celular. Os instrumentos chamados Quimiostato e Turbiostato, respectivamente por meio da concentração e da turbidez dos nutrientes, inspecionam incessantemente o desenvolvimento da cultura. Nestes equipamentos, há um sistema de automação que aciona o momento ideal para que ocorra a diluição (Dias, 2017).

1.3.4 Regimes de cultivo usados para a produção de biomassa microalgal

As microalgas podem ser cultivadas em quatro distintos regimes: (i) fotoautotrófico, (ii) fotoheterotrófico, (iii) mixotrófico e (iv) heterotrófico. No regime fotoautotrófico, a luz (sintética ou solar) é usado como fonte principal de energia e o CO₂ como fonte de carbono inorgânico para o crescimento das microalgas (Azeredo, 2012). Nos sistemas fotoheterotróficos, as microalgas usam a luz e compostos orgânicos previamente introduzidos ao meio de cultivo para seu desenvolvimento (Vidal, 2016). Nos regimes heterotróficos, compostos orgânicos são usados como fonte principal de energia e carbono para o crescimento das células, enquanto os sistemas mixotróficos precisam de duas etapas: uma em sistema autotrófico, e outra em sistema heterotrófico (Azeredo, 2012).

Quadro 6 - Cultivo de distintas espécies de microalgas e seus referentes regimes de cultivo.

Espécie de microalga	Regime de cultivo	Sistema de cultivo	Tipo de sistema de cultivo	Referência
<i>Chlorella sp</i>	Mixotrófico	Aberto / Fechado	Fotobiorreator	Amaral, 2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mixotrófico	Fechado	Fotobiorreator	Bastos, 2017
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Mixotrófico	Aberto / Fechado	In vitro / Fotobiorreator	Erazo, 2017

O Quadro 6 mostra os respectivos regimes de cultivo de três espécies de microalgas de grande relevância comercial. Os sistemas mixotróficos constituem a combinação dos sistemas fechados (fotobiorreatores) e abertos (raceway), capazes de reduzir os custos do processo de produção de biomassa. Na primeira fase é empregado meio de cultivo rico em nutrientes e fatores bióticos e abióticos regulados para a obtenção de biomassa. Na segunda fase, a biomassa gerada é sujeita a condições ambientais naturais, como a carência de nitrogênio e fósforo e a acentuada exposição à iluminação. Dessa maneira, esses sistemas híbridos têm o objetivo de elevar a produtividade de células e o interior lipídico nas microalgas. Sendo assim, uma das maiores vantagens desses sistemas é a diminuição de contaminações do cultivo, pois na primeira fase são empregados fotobiorreatores em sistemas fechados (Azeredo, 2012).

Este meio mixotrófico é considerado uma alternativa para a produção fotoautotrófica. Heredia-Arroyo *et al.* (2010) cultivaram a microalga *Chlorella protothecoides* nos regimes fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico e observaram uma maior taxa de crescimento celular nos dois últimos sistemas.

1.3.5 Atividade antibacteriana das microalgas

Na década de 1940, Pratt *et al.* divulgou um trabalho demonstrando a atividade antibacteriana da clorolina, uma substância antibacteriana da *Chlorella*. Este antibiótico, que consiste numa mistura de ácidos graxos da microalga *Chlorella sp.*, apresentou atividade contra várias bactérias gram positivas e gram negativas (Pratt *et al.*, 1944). Desde esse acontecimento, diversas substâncias antibacterianas foram caracterizadas em microalgas, tais como os ácidos graxos (Desbois *et al.*, 2009; Khoeyi *et al.*, 2012; Sanabria-ríos *et al.*, 2014) que possuem diversos modos para inibir o crescimento de bactérias.

Os ácidos graxos são capazes de inibir a produção de algumas enzimas bacterianas (Kurihara *et al.*, 1999), também podem modificar a permeabilidade da parede celular bacteriana

através da penetração de suas longas cadeias de carbono (Galbraith e Milter, 1973), e conter a absorção de nutrientes do meio ambiente, impossibilitando o crescimento bacteriano (Desbois e Smith, 2010). No entanto, embora estudos mostrem que as microalgas podem exercer papel como agentes antimicrobianos, a quimiodiversidade deste grupo se restringe a determinadas espécies, e, assim, tal atividade antibacteriana pode variar. Ademais, há diferenças na eficiência antibacteriana de um composto entre bactérias gram positivas e gram negativas. Devido à presença de lipopolissacarídeos na membrana externa em bactérias gram negativas, apresentam-se mais resistentes a compostos antibióticos do que as bactérias gram positivas, pois esta característica confere-lhes uma proteção contra a penetração dos compostos extracelulares (Takeuchi et al., 1999).

Dentre as atividades antibacterianas descobertas em alguns compostos isolados de microalgas, estão os extratos metanólicos de *Chlorella vulgaris*. Esta microalga contém compostos fenólicos como flavonóides e taninos que garantem sua atividade antibacteriana contra várias bactérias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* (Syed et al., 2015). Já a microalga *Dunaliella salina*, por exemplo, consegue produzir exopolissacarídeos que também representam bons agentes antibacterianos (Raposo et al., 2014a). Estudos feitos por Mendiola et al. (2008) mostraram que há uma atividade considerável de *D. salina* contra *E. coli* e *S. aureus*. O Quadro 7 mostra a presença de compostos com atividade antibacteriana, identificados em algumas microalgas.

Quadro 7 - Identificação de compostos de microalgas que apresentam atividades antibacterianas consideráveis.

Compostos com atividades antibacterianas identificados em microalgas			
Microalga	Composto antibacteriano	Exemplos de bactérias alvo	Referências
<i>Chlorella sp.</i>	Mistura de ácidos graxos	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>	Pratt et al. (1944)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Compostos fenólicos	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	Syed et al. (2015)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ácido graxo de cadeia curta	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Santoyo et al. (2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ácido graxo de cadeia longa	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella sp.</i>	Guedes et al. (2011)

Uma alta diversidade de extratos de microalgas dispõem de atividade antimicrobiana *in vitro*. *Chlorella* e *Arthrospira* são os gêneros mais estudados (Buono et al., 2014). Um método *in vitro* padronizado e amplamente utilizado em experimentos com microalgas, para avaliar a atividade antibacteriana de um composto, permitindo assim uma análise da sua faixa de concentração, é o método de difusão. Heatley, em 1944, desenvolveu este método para ensaios de penicilina com métodos de difusão em disco de ágar. O método de difusão em disco de ágar (Figura 4) tem como principal princípio a inoculação de placas de ágar com uma concentração pré-estabelecida de bactérias, e colocar um disco de papel de filtro na superfície do ágar impregnado com uma concentração conhecida da substância a ser testada. Os resultados são estipulados através da medição, com uma régua, da zona de inibição formada em torno do disco (Wikins et al., 1972). Métodos de difusão apresentam baixo custo, simplicidade, são fáceis de se terem seus resultados interpretados, entretanto, são qualitativos, isto é, não permitem a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) de uma substância, além de não serem capazes de distinguir os efeitos bacteriostáticos dos bactericidas (Jorgensen e Ferraro, 2009). Portanto, segundo Balouiri et al. (2016), os métodos de diluição em caldo se destacam por serem bem singulares, pois conseguem estimar os valores de MIC de um composto. Neste método, adiciona-se ao meio de cultura bacteriano uma concentração determinada do composto testado, com cultura em fase exponencial em uma concentração definida. Posteriormente, pode ser feita uma medição da densidade óptica (DO) ou uma avaliação visual da opacidade do meio de cultura (Clínica e Laboratorial Standards Institute, 2015).

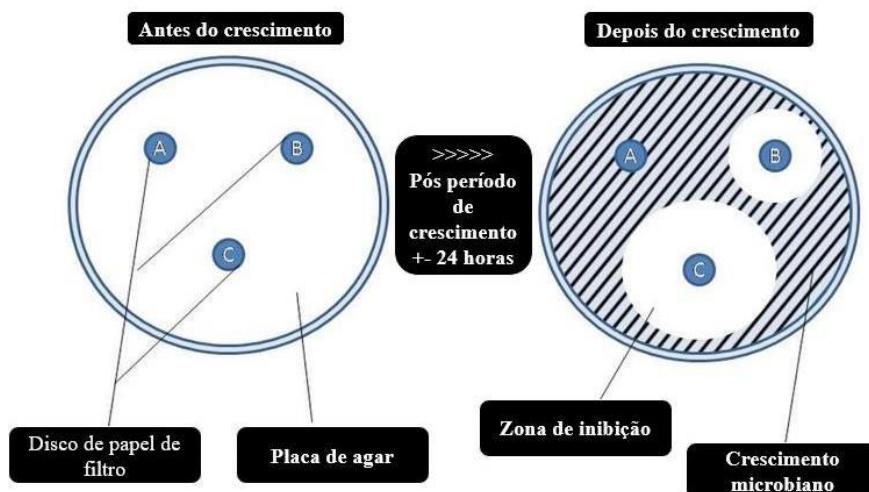


Figura 4 – Representação do método de difusão em disco de ágar.

No tocante aos experimentos *in vivo*, pode ser feita uma cocultura, durante vários dias, de microalgas e bactérias e, então, o crescimento bacteriano no meio de microalga pode ser

afferido. As curvas de crescimento bacteriano são estabelecidas, por exemplo, pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de ágar de uma amostra diluída do meio de cocultura (Kokou et al., 2012; Molina-Cárdenas et al., 2014; Tendencia e de la Peña, 2003; Terekhova et al., 2009). Esse método geralmente é utilizado quando o suposto composto antibacteriano é solúvel em água ou naturalmente liberado pelas microalgas (Muller-Feuga, 2000; Neori, 2011).

1.3.6 Atividade antifúngica das microalgas

Novos medicamentos antifúngicos têm sido desenvolvidos a fim de conter a expansão dos fungos resistentes. As microalgas, devido a sua diversidade e seu conteúdo em compostos bioativos, tornaram-se concorrentes promissores (Skulberg, 2000). Algumas microalgas verdes, como as do gênero *Chlorella*, produzem compostos bioativos que têm potencial como agentes antimicrobianos. Estudos feitos por Ghasemi et al. (2007) evidenciam uma atividade antifúngica de sobrenadantes de cultura de *C. vulgaris* contra *Candida kefyr*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*. Sabe-se que compostos bioativos são regularmente solúveis em solventes orgânicos. A fim de verificar este fato, uma pesquisa feita por ABEDIN e TAHA (2008) comprovou que extratos da microalga *Chlorococcum humicola*, de água doce, com diferentes solventes orgânicos (acetona, benzeno, etanol, metanol, entre outros) apresentam atividade antifúngica contra *C. albicans*, *A. niger* e *A. flavus*.

1.4 Ácido Levulínico, Levulinato de Cálcio e Ácido p-anísico

Além das microalgas, há outros compostos que apresentam potenciais antimicrobianos com diversas aplicações de grande interesse industrial: Ácido Levulínico, Levulinato de Cálcio e Ácido P-anísico.

Ácido Levulínico, também conhecido como ácido 4-oxopentanoico, é um composto classificado como um cetoácido, isto é, ácido orgânico que possui um grupo funcional carbonila e um grupo ácido carboxílico (Merck Index 11th Edition, 1989). É oriundo da degradação da celulose (um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas) e consiste em um sólido branco cristalino solúvel em água, etanol e éter dietílico. O ácido Levulínico é uma biomassa capaz de substituir o petróleo, porém sem gerar enormes danos à natureza.

Nas indústrias, o Ácido Levulínico pode dispor de muitas aplicações como, por exemplo, na síntese de solventes, pesticidas, polímeros, poliésteres, aditivos de combustíveis e na indústria farmacêutica (Manzer, 2014). Em vista disso, a procura por Ácido Levulínico é por

volta de 2600 toneladas por ano, e essa possivelmente se ampliará de maneira contínua no futuro (Research GV, 2014).

As plantas utilizam mecanismos de defesa química que são tidos como a base natural para os antimicrobianos aplicados nas criações cosméticas. Atualmente, as indústrias de cosméticos apresentam determinados ácidos orgânicos como alternativas aos parabenos. Esses compostos não necessitam ser manifestados como conservantes, pois possuem outras finalidades na composição, no entanto, resultados de estudos microbiológicos evidenciaram sua efetividade (Ibarra, Johnson, 2008).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos ocorre da seguinte maneira: A célula, por meio da membrana, se associa a moléculas de ácido protonadas. No citoplasma, o ácido se dissocia e altera o pH interno. Para conservar a homeostase, ou seja, o equilíbrio, o microrganismo extingue íons H⁺ em troca de Na⁺. A taxa de reprodução celular é reduzida severamente por causa do desequilíbrio do pH citoplasmático e do gasto de energia. Também, devido ao meio extracelular ter se tornado mais ácido, a membrana da célula concede maior influxo de cálcio, que é a substância ativa responsável. Tal processo finaliza com a morte celular (Ibarra, Johnson, 2008).

Além disso, os ácidos orgânicos para serem usados como conservantes, precisam de alguns atributos, tais quais: disponibilidade na forma protonada no pH da formulação; ser solúvel em meio aquoso; estrutura química que possibilite a passagem pela membrana celular; e dissociação rápida quando em contato com o citoplasma (Research GV, 2014).

O Levulinato de Cálcio (Figura 5), outro composto estudado neste trabalho, é gerado a partir de uma reação direta entre a levulose do ácido L- ou levulínico e o hidróxido de cálcio. Levulinato de Cálcio/L-lisina é comumente utilizado para controle, prevenção e tratamento de doenças como hipercalcemia aguda, osteoporose e artrite reumatóide. Pesquisas sugerem que uma vez administrado no organismo, Levulinato é metabolizado em 4-hidroxipentanoato, um composto com efeitos farmacológicos parecidos (Manzer L.E., 2004).

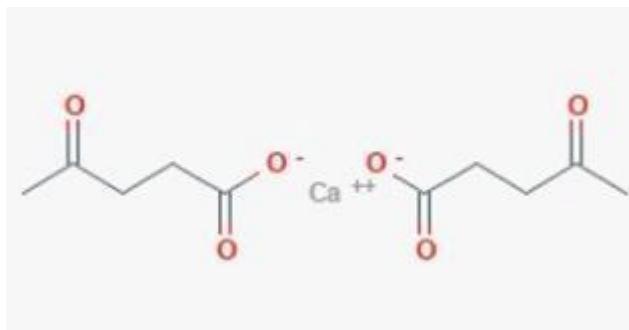


Figura 5 - Estrutura química molecular do levulinato de cálcio (indice.eu).

Já o ácido P-anísico (Figura 6), também conhecido como ácido 4-metoxibenzóico, é um composto sólido cristalino branco e integra a classe dos compostos derivados do cresol. É solúvel em água quente e sua solução aquosa é fracamente ácida. O ácido P-anísico e seus derivados são amplamente aplicados como intermediários em reações químicas para a criação de tinturas e perfumes. Possui propriedades antissépticas, tem função como repelente e ovicida de insetos, e também apresenta propriedades bactericidas e de fragrância, sendo bastante empregados na indústria farmacêutica, por exemplo, como componentes de fármacos.

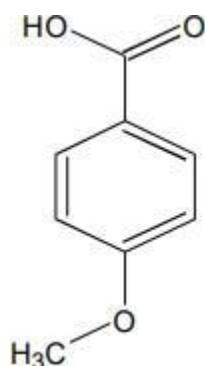


Figura 6 - Estrutura química molecular do ácido P-anísico.

A pesquisa e introdução dos três compostos como alternativas de conservantes disponíveis no mercado são em virtude às barreiras/controles das concentrações recomendadas pelos órgãos regulamentadores e perigos à saúde da população consumidora. Os grupos funcionais ésteres e ácidos são encontrados, respectivamente, no Levulinato e no Ácido P-anísico e Ácido Levulínico, e configuram-se, atualmente, como opções nas indústrias, uma vez que suas presenças em determinadas formulações de fragrâncias já apresentaram ação antimicrobiana, havendo a capacidade de atravessar e desfazer a integridade das membranas dos microrganismos, tais como de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, indicados pela Associação Brasileira de Cosmetologia e United States Pharmacopeia, USP (Ibarra, Johnson, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil responde a um mercado externo e interno em contínuo crescimento. O vasto aumento da priorização na ingestão de néctares e refrescos industrializados deve-se ao ritmo de vida acelerado da população atual, somado à praticidade de preparo e armazenagem. Portanto, é imprescindível que haja pesquisas que garantam uma maior qualidade higiênico-sanitária dos produtos industrializados, como é o caso desta pesquisa acerca do desenvolvimento de novos conservantes de base natural que possam ter um papel promotor na saúde do público consumidor. Além disso, a sociedade, cada vez mais, tem se tornado bastante exigente e consciente no tocante aos produtos que consomem, buscando pela ingestão de bebidas naturais que estejam em concordância com o regulamento da sustentabilidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial antimicrobiano de extratos de microalgas, além de levulinato a ácido anísico, como conservantes naturais e sua eficiência em 2 tipos de bebidas não alcoólicas, quais sejam: néctar de laranja e refresco de laranja.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar os meios de cultura propícios para crescimento diferencial de microrganismos presentes nas bebidas;
- Seleção e cultivo de microalgas para obtenção de biomassa;
- Caracterizar um padrão de microrganismos clínicos a serem identificados e estudados;
- Isolar os microrganismos identificados no MALDI-TOF MS para auxiliar na análise das bactérias e, consequentemente, avaliar sua susceptibilidade aos produtos investigados.
- Identificar a concentração ótima predita pelos ensaios face o uso da biomassa de diferentes microalgas e demais conservantes naturais, na inibição do crescimento dos grupos microbianos indesejados;
- Comparar qualitativamente a formação de halos de inibição entre os diferentes microrganismos na presença dos conservantes naturais;
- Revelar uma hierarquia em termos de desempenho dos diferentes tipos de conservantes testados, tendo como variável de resposta a eficácia de atuação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, conforme pode ser visto na figura a seguir, as etapas que compõem a metodologia foram subdivididas em dez passos importantes. A princípio foi feita uma seleção de cinco cepas distintas de microalgas e das substâncias ácido levulínico, levulinato de butila, levulinato de cálcio e ácido P-anísico. Em seguida, houve a seleção e produção das bebidas. Posteriormente, foram obtidos meios de cultura diferentes para seleção microbiológica. Logo após, sucedeu à semeadura das amostras de bebida e isolamento dos microrganismos que cresceram nas placas. Feita a semeadura, os microrganismos foram identificados em um espectrômetro de massas e, baseado neste resultado, foram realizados testes de inibição do crescimento microbiano dos grupos identificados como potenciais contaminantes. Subsequente ao antibiograma, ocorreu a determinação dos melhores conservantes em teste, com suas respectivas concentrações que apresentaram melhores resultados em termos de eficácia, para assim ser elaborada uma matriz de combinação. Após a laboração da matriz de combinação entre agentes microbianos identificados, foram preparados os coquetéis de conservantes naturais e os néctares e refrescos de laranja para serem adicionados aos coquetéis e, enfim, executar a técnica de Filtração por Membrana. Por fim, houve um acompanhamento, após 15 dias da produção dos néctares e refrescos, das cepas microbianas identificadas nas bebidas.

4.1 Seleção das cepas de microalgas com potencial antimicrobiano e outras substâncias

Foram escolhidas as seguintes cepas da coleção do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (LEAF) localizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro: *Spirulina maxima*, *Chlorella sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* e *Scenedesmus obliquus*. Tais escolhas foram baseadas na disponibilidade de microalgas existentes no LEAF e em relatos da literatura envolvendo essas microalgas. Foram compradas as substâncias conhecidas como ácido levulínico, levulinato de butila, levulinato de cálcio e ácido P-anísico, que também foram analisadas em relação aos seus potenciais aspectos antimicrobianos.

O meio de cultura escolhido para o cultivo das microalgas foi o BBM (Bold's Basal Medium) (NICHOLS & BOLD, 1965). A cada duas semanas foram efetuados repiques das microalgas em meio BBM com o intuito de atingir um crescimento de culturas suficiente para a obtenção de uma densidade celular diretamente relacionada com os compostos bioativos produzidos, e, foram feitas as junções dos pellets. Os crescimentos das culturas foram acompanhados através da leitura da absorbância (Espectrofotômetro DR/2000). Quando

cultivadas em BBM, até o 14º dia as microalgas ainda se apresentavam em crescimento (6.029×108 cél/ml).

Para fins de delineamento e validação dos resultados, quando as microalgas obtiveram, no espectrofômetro um comprimento de onda entre 1,6 e 2 nm, os repiques puderam ser cessados. Após cada repique, as culturas foram centrifugadas (em uma ultracentrífuga capaz de sedimentar partículas muito pequenas, uma vez que atinge altas velocidades de rotação), a 7000 força gravitacional durante 10 minutos, para posterior recolhimento dos pellets, seguido do armazenamento da biomassa no freezer com temperaturas de -14º C a -25º C.

4.2 Seleção das bebidas

As bebidas escolhidas e testadas para execução do presente trabalho foram néctar de laranja e refresco de laranja. Os motivos para a seleção foram pautados, fundamentalmente, no destaque do país como maior produtor mundial de laranja e exportador de suco da fruta.

Foi comprada água mineral que, antes de ser adicionada no processo de produção das bebidas, foi semeada em uma placa de petri com meio ágar BHI para verificar se, após 24h na estufa bacteriológica, haveria crescimento de microrganismos contaminantes. A partir da validação de esterilidade da água mineral comprada, as laranjas do tipo pêra foram deixadas de molho na solução de água potável e água sanitária (concentração de 0,1% v/v, ou seja, 50 ml de água sanitária para cada litro de água) por cerca de 15 minutos.

Após esse período, todo o processo foi conduzido na câmara de fluxo laminar, em que a bebida com néctar continha uma proporção de 50% do suco da fruta e refresco, 30%. As laranjas foram espremidas manualmente com o uso de luvas de nitrila. Os extratos da laranja passaram em um funil de vidro autoclavado com papel qualitativo e foram despejados em Erlenmeyer autoclavado. Para atestar a quantidade certa da concentração de suco, foi utilizada uma proveta de vidro para medir.

4.3 Seleção de grupos microbiológicos para semear as bebidas

Foram gentilmente fornecidos pela Empresa Sigma-Aldrich, de propriedade da Merck KGaA, 3 meios de cultura de amplo espectro para crescimento de fungos e bactérias: Brain Heart Infusion (BHI), Ágar Sangue, e Sabouraud Dextrose Ágar. Os meios de cultura foram selecionados para promover o crescimento, multiplicação e posterior análise dos microrganismos existentes nas bebidas.

O meio Ágar BHI (Quadro 8), conhecido como ágar de infusão de cérebro e coração, consiste em um meio sólido recomendado para o cultivo de bactérias patogênicas exigentes e fungos provenientes de amostras clínicas e não clínicas. Organismos fastidiosos com requisitos nutricionais exigentes conseguem ser cultivados em meios de infusão, sem a adição de enriquecimento, como sangue animal (Murray *et al.*, 1999).

Quadro 8 - Descrição da composição do meio Brain Heart Infusion (BHI), preparado em 1L de água deionizada com pH $7,4 \pm 0,2$ a 25°C (Sutton, D.A., 2003).

Meio BHI – Composição	
Formulação	Concentração (g/L)
Cérebro de boi, infusão de 200g	7,7
Coração de boi, infusão a partir de 250g	9,8
Proteose Peptona	10
Dextrose	2
Cloreto de Sódio	5
Fosfato dissódico	2,5
Bacto Agar	15

O meio Ágar Sabouraud Dextrose (Quadro 9) é comumente utilizado para o cultivo de fungos (filamentosos e leveduras) patogênicos e não patogênicos e de bactérias acidúricas. O pH reduzido propicia o crescimento de dermatófitos e inibe algumas espécies bacterianas de interesse clínico, ou seja, torna o meio inapropriado para o desenvolvimento de bactérias e ligeiramente seletivo contra as mesmas (Sutton, 2003).

Quadro 9 - Descrição da composição do meio Ágar Sabouraud Dextrose, preparado em 1L de água ultra purificada, com pH $5,6 \pm 0,2$ a 25°C . (Sutton, D.A., 2003).

Meio Ágar Sabouraud Dextrose - Composição	
Formulação	Concentração (g/L)
Hidrolisado pancreático de caseína	5
Hidrolisado péptico de tecido animal	5
Dextrose	40
Cloranfenicol	0,05
Ágar Base	16

O meio Ágar Sangue (Quadro 10) é um meio de cultivo de base rica para a grande maioria de bactérias gram positivas e gram negativas. É recomendado para cultivo de microrganismos fastidiosos com atividade hemolítica, presentes em amostras de fluídios

biológicos e outras amostras clínicas. O Sangue desfibrinado de carneiro, introduzido ao meio, viabiliza fatores de crescimento para uma extensa variedade de gêneros de interesse clínico (Murray *et al.*, 1999).

Quadro 10 - Descrição da composição do meio Ágar Sangue de carneiro, com pH $7,3 \pm 0,2$ (Sutton, D.A., 2003).

Base de Ágar Sangue – Composição	
Formulação	Concentração (g/L)
Peptona de caseína	10
Peptona de carne	5
Extrato de levedura	5
Infuso de carne	3
Amido de milho	1
Cloreto de sódio	5
Ágar	13,5

4.4 Semeadura das amostras de bebida, isolamento e identificação dos microrganismos

Dentro da câmara de fluxo laminar, as amostras de néctar e refresco foram semeadas com o uso de alças de Drigalski descartáveis, nas concentrações de 100µl, 250µl e 500µl, nas placas de petri contendo os meios de cultura para crescimento de fungos e bactérias e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24h, a 37°C. Este procedimento foi repetido para os tempos de exposição de 48h e 72h, isto é, as placas foram observadas em 24h e foram reincubadas, fazendo leituras nos tempos posteriores.

Os microrganismos crescidos nas placas contendo as bebidas foram levados para ser realizada uma identificação fenotípica (MALDI-TOF MS) no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes. Este é um método de espectrometria de massas que gera resultados altamente precisos e confiáveis para microrganismos clínicos, em um curto período.

Sucintamente, a ilustração a seguir (Figura 7) apresenta as etapas de execução da técnica de MALDI-TOF MS, quais sejam: o material a ser examinado é inserido em uma matriz sólida polimérica e, em seguida, raios laser de nitrogênio atingem a amostra fazendo com que a mesma sofra uma vaporização e ionização das moléculas. As moléculas liberadas e ionizadas atravessam um tubo de voo até alcançarem o detector. Há um banco de dados, um *fingerprint*, que possui o perfil das proteínas ribossomais constitutivas de espécies bacterianas e de fungos. Um espectro único é formado a partir de cada espécie, distinto dos espectros formados por outras espécies bacterianas. Este *software* faz uma leitura dos picos gerados de cada amostra e disponibiliza o valor do score, onde a cor verde indica uma alta probabilidade de identificação

ao nível de espécie ou uma identificação segura para gênero e provável identificação ao nível de espécie, a amarela significa uma provável identificação ao nível de gênero, e a vermelha indica a não identificação do microrganismo.

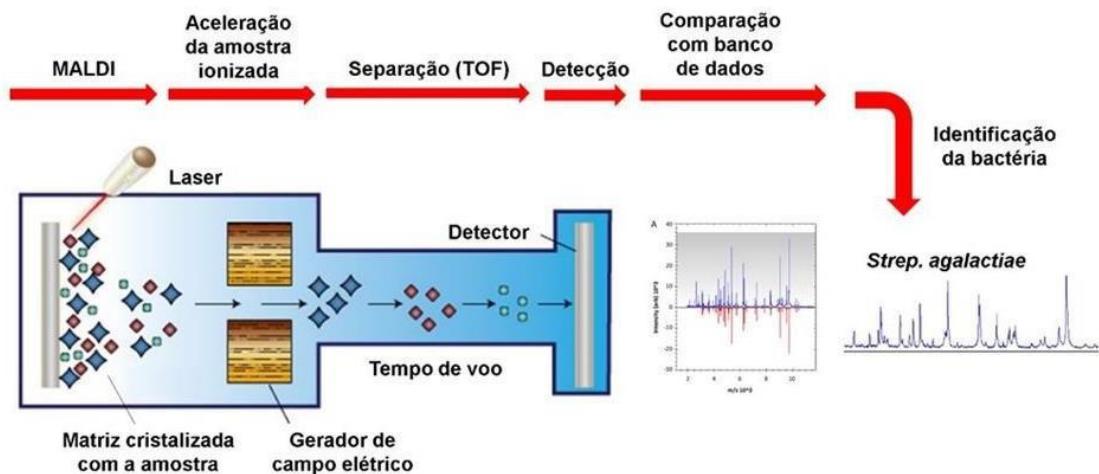


Figura 7 - Esquema ilustrativo gráfico representando a execução de um equipamento de MALDI-TOF durante o reconhecimento de microrganismos.
Fonte: SANTOS, TOMAZI, 2018

4.5 Cultivo dos microrganismos isolados e testes de inibição do crescimento microbiano

Os meios BHI e ágar sangue foram preparados e vertidos nas placas de petri com o mesmo volume de 20 ml cada. Cada microrganismo identificado foi semeado de forma individual (1 mL) em meios sólidos (BHI e ágar sangue) em placa de petri. A semeadura foi do tipo distenção ou spread-plate, havendo o espalhamento uniforme com alça de Drigalski descartável estéril para obtenção de crescimento confluente.

As substâncias com potencial antimicrobiano, em diferentes concentrações (mg/mL ou mg/L), foram adicionadas no interior de poços centralizados nas placas de petri. Estes poços foram feitos com pipeta Pasteur de vidro autoclavados, dentro da câmara de fluxo laminar, e tinham diâmetros de 6 mm. Os poços se assemelham ao teste do antibiograma, que se utiliza de discos de celulose, uma vez que busca a formação do halo de inibição. O antibiograma (Figura 8) é um teste de sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de difusão em meio sólido, capaz de fornecer um resultado qualitativo, onde há comparação do tamanho do halo de inibição do crescimento bacteriano.

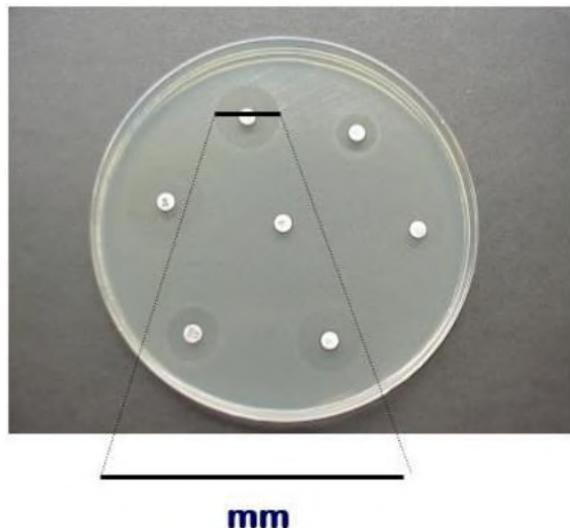


Figura 8 – Leitura e interpretação de um dos testes de determinação da sensibilidade (Antibiograma): método de difusão a partir de disco de ágar. A leitura é realizada no fundo da placa com auxílio de uma régua.

Cada placa possuía uma divisão em 4 partes em que foram feitos 4 poços em extremidades opostas para serem introduzidos 100 microlitros de cada substância. As placas foram incubadas a 37°C, durante 4 dias. As concentrações testadas foram: 100 ppm dos extratos aquosos de cada microalga; 0.1, 1.0 e 5.0 ppm de solução aquosa de ácido p-anísico; 0.5, 1.0 e 50 ppm de levulinato de butila; 0.1 e 5.0 ppm de levulinato de cálcio; e 1.0, 5.0 e 50 ppm de ácido levulínico. Tais faixas de concentrações, em ppm, foram escolhidas baseadas em um projeto de cunho sigiloso do LEAF, ainda não publicado, que também pesquisou acerca dos potenciais das microalgas e das demais substâncias supracitadas como possíveis conservantes em outras bebidas.

Os extratos aquosos das microalgas *Spirulina maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* e *Scenedesmus obliquus* foram feitos introduzindo água nos pellets armazenados após os repiques. Já a microalga *Chlorella sp.* teve uma preparação diferente, uma vez que as células desta microalga são revestidas por paredes celulares rígidas de celulose, portanto é essencial que haja o processo de ruptura celular para que seu conteúdo se torne acessível e digerível. O método de ruptura celular utilizado na presente pesquisa foi o tratamento mecânico, sendo este o mais indicado por ser mais delicado com a célula da microalga. Através da técnica detalhada a seguir, é possível romper a parede celular externa e conservar os nutrientes indispensáveis, preservando elementos como as proteínas, vitaminas e minerais.

Inicialmente, o extrato de microalga foi macerado com pistilo, depois pesado em um bequer e transferido para um tubo falcon. Como foi escolhida a concentração de 100ppm, foi pesado 10mg de *Chlorella sp*, e em seguida, foi colocado pérola de vidro (o dobro da quantidade de microalga). Pérola de vidro é indicada para aquecer a solução por igual. Em um tubo Falcon foram adicionadas 10mg de biomassa macerada e pérolas de vidro na concentração 1:1. A seguir 10 mL de água destilada foram adicionados e o tubo foi submetido a dois ciclos no vórtex por 2 min e 10 min na lavadora ultrassônica. O objetivo da metodologia é destruir a parede celular e minimizar possíveis riscos de contaminação. Por fim, as células foram avaliadas ao microscópio ótico entre lâmina e lamínula, sob a lente objetiva 40X, para avaliar o rompimento celular (Figura 9).



Figura 9 – Microscopia óptica de *Chlorella sp* com parede celular rompida.

Após o período de 4 dias, foi estudado o índice de inibição, a partir do halo formado nas placas. Os diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano ao redor de cada disco foram mensurados em milímetros ao longo de 2, 3 e 4 dias. O melhor período para análise dos halos de inibição foi de 48h, em estufa a 37°C, e foi determinado baseado no período de maior tamanho em diâmetro do halo formado. Como não há na literatura um padrão estabelecido de classificação de halos em resposta ao uso de microalgas e das demais substâncias testadas, foi criada uma metodologia em que foram feitas as medições dos tamanhos do halo formado ao redor do poço e do poço e comparações entre os resultados. Portanto, as inibições foram ranqueadas em ordem crescente, da seguinte maneira:

- (+) - pequena inibição;
- (++) - média inibição;
- (+++) - alta inibição.

4.6 Matriz de combinação entre agentes microbianos identificados

A partir do resultado dos testes de inibição do crescimento microbiano, foi construída uma matriz de combinação entre os conservantes mais bem sucedidos. O ensaio controle foi elaborado utilizando benzoato e sorbato, que são os conservantes sintéticos mais recorrentemente aplicados comercialmente, de acordo com a análise dos dados reportados pela literatura.

4.7 Produção dos coquetéis de conservantes naturais

Os coquetéis de conservantes em teste foram pesados e introduzidos em tubos Eppendorfs de 1,5 ml, seguidos para armazenamento na geladeira até sua utilização. Para a elaboração dos coquetéis de conservantes industriais, isto é, do ensaio controle, foram pesados 0,05g de benzoato de sódio e 0,08g de sorbato, que são as quantidades permitidas para volumes de sucos de 100ml, segundo a Resolução RDC 5 da ANVISA. Em uma Câmara de Fluxo Laminar foram feitas as seguintes bebidas:

Quadro 11– Bebidas preparadas para posterior adição dos coquetéis de conservantes.

BEBIDAS PRODUZIDAS
Néctar sem conservante
Refresco sem conservante
Néctar com benzoato (conservante industrial)
Néctar com sorbato (conservante industrial)
Refresco com benzoato (conservante industrial)
Refresco com sorbato (conservante industrial)
Uma bebida de néctar para cada conservante em teste
Uma bebida de refresco para cada conservante em teste

Cada bebida apresentava volume de 100 ml. Foram adicionados 1 mL dos coquetéis de conservantes, separadamente, em suas respectivas bebidas de 99 mL para, então, ser iniciada a técnica de Filtração em Membrana.

4.8 Técnica de Inoculação por Plaqueamento – Filtração por Membrana

O Método de Filtração por Membrana é realizado pela filtração do produto através de membranas estéreis de celulose, de porosidade conhecida e homogênea (poros de 0,22 μm ou 0,45 μm), que retém na superfície os microrganismos presentes na amostra (microrganismos com diâmetro superior aos poros). Em seguida, esta membrana é inoculada nos meios de cultura recomendados. Caso seja necessário, a membrana pode ser lavada com volumes de 100 ml de fluidos de lavagem para retirada de possíveis resíduos de substâncias inibitórias. O princípio da metodologia de Filtração por Membrana baseia-se, sucintamente, nas etapas imediatas:

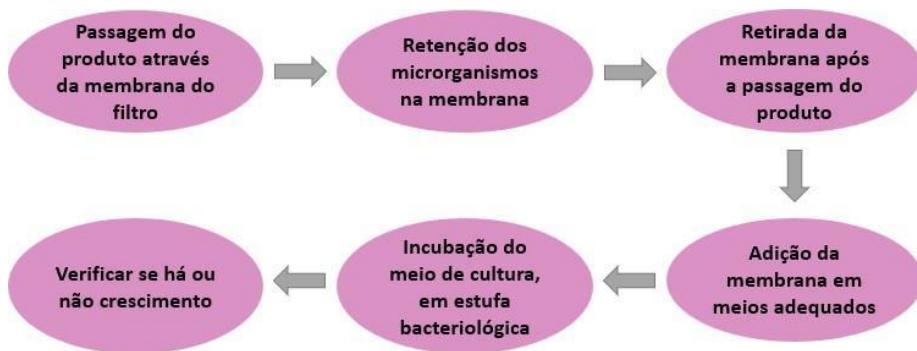


Figura 10 – Fluxograma esquemático das etapas da Filtração por Membrana.

Todos os nutrientes se difundem pela membrana atingindo os microrganismos que se localizam na superfície. Após a incubação, faz-se a contagem das colônias desenvolvidas e calcula-se a concentração microbiana da amostra. Cada microrganismo que se encontra isolado na superfície dará origem à 1 UFC, logo, o resultado é quantitativo.

Na parte inferior externa da placa de Petri todos os dados das amostras (bebidas) necessários à sua identificação foram anotados. As amostras foram agitadas para que as mesmas se tornassem homogêneas, e, todo o procedimento de plaqueamento foi feito de forma asséptica. O volume das amostras (25 mL), portanto, foi vertido cuidadosamente no porta-filtro e a bomba de vácuo foi ligada. Posterior à filtração das bebidas, as membranas foram retiradas do filtro, com o auxílio da pinça flambada e resfriada. E então, as membranas, com as superfícies quadriculadas voltadas para cima, foram depositadas nos meios de cultura sólidos (ágar BHI e ágar sangue).

É crucial verificar se houve formação de bolhas de ar entre a membrana e o meio de cultura. Se isto acontecer, é preciso levantar e recolocar a membrana, com pinça, fazendo com que a(s) bolha(s) seja(m) eliminada(s). A bolha de ar impede a difusão do meio de cultura para

a superfície da membrana, impossibilitando a nutrição do microrganismo que se localiza nesta área. Ou seja, quanto maior o diâmetro de bolha, menor a área superficial de contato e acesso dos microrganismos para que possa promover a transferência de nutrientes. Além disso, é necessário averiguar se a pressão da bomba de vácuo está entre 510 e 685 mmHg ou 20 a 27 inHg, pois valores de pressão acima do especificado são capazes de deteriorar a membrana, podendo causar fissura em sua superfície e modificar os resultados das análises.



Figura 11 – Ilustração do frasco esterilizado utilizado no sistema de filtração.

Fonte: Fundação CECIERJ

4.9 Acompanhamento de cepas microbianas nas bebidas

Após 15 dias da produção das bebidas, as bebidas contendo os melhores resultados na contagem de UFC/ml, isto é, as menores contagens, foram semeadas em placas de meio BHI e em placas de meio ágar sangue, e as colônias bacterianas obtidas foram submetidas à identificação no aparelho de MALDI-TOF MS.

5 RESULTADOS

5.1 Semeadura das amostras de bebida, isolamento e identificação dos microrganismos

Após o cumprimento das etapas metodológicas de plaqueamento das bebidas em triplicata nos meios estudados e, incubação na estufa bacteriológica por 48h, os microrganismos crescidos nos meios foram identificados no aparelho de MALDI-TOF MS. Todas as colônias levadas para identificação tinham características morfológicas distintas. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), a técnica de espectrometria de massas foi capaz de reconhecer 8 das 10 cepas isoladas:

Tabela 1 – Identificação, através do MALDI-TOF MS, dos microrganismos presentes nas bebidas de laranja.

Resultados MALDI-TOF MS		
CEPA	MICRORGANISMO	BEBIDA
1	sem identificação	néctar
2	<i>Kosakonia cowanii</i>	néctar
3	<i>Klebsiella variicola</i>	néctar
4	<i>Kosakonia cowanii</i>	néctar
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	refresco
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	refresco
7	<i>Bacillus cereus</i>	refresco
8	<i>Kosakonia cowanii</i>	refresco
9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	refresco
10	sem identificação	refresco

Kosakonia cowanii, anteriormente conhecida como *Enterobacter cowanii*, é uma bactéria gram-negativa, móvel, facultativamente anaeróbia, em forma de bastonete; reconhecida como um patógeno vegetal encontrado no solo, na água e no esgoto (Berinson, *et al.*, 2020). *Klebsiella variicola* é uma espécie bacteriana gram-negativa originalmente descrita como um endossimbionte benigno nas plantas, no entanto, tem sido relacionada a infecções oportunistas em seres humanos (Medina, *et al.*, 2019). *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos, encontrada na microbiota humana, porém, é considerado um patógeno oportunista, cujas infecções estão principalmente relacionadas à produção de biofilme (Pinheiro, 2014). *Bacillus cereus* é uma bactéria beta-hemolítica gram-positiva, characteristicamente endêmica, atuante na deterioração dos alimentos e associada à produção de enterotoxina (Batista, *et.al*, 2018). Por último, *Klebsiella oxytoca* é uma bactéria responsável por diversas infecções do trato urinário, assim como pela septicemia, que é uma infecção bastante preocupante do sangue, podendo ser fatal (Almeida, 2005).

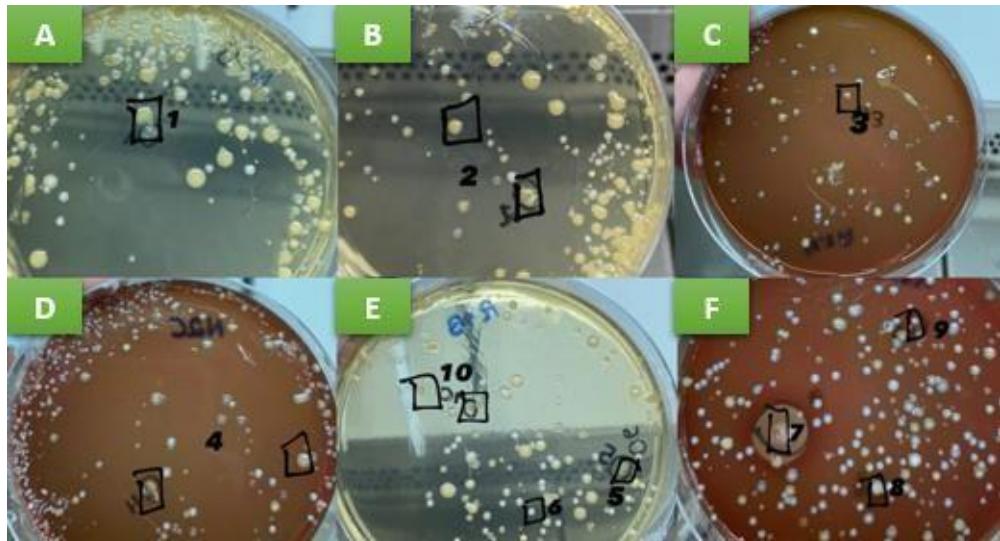


Figura 12 – As 10 cepas de microrganismos escolhidas para serem levadas ao MALDI-TOF MS. (A) Microrganismo não identificado. (B) *Kosakonia cowanii*. (C) *Klebsiella variicola*. (D) *Kosakonia cowanii*. (E) As cepas 5 e 6 isoladas tiveram como identificação o microrganismo *Staphylococcus epidermidis*; a cepa 10 não foi identificada. (F) A cepa 7 teve como identificação o microrganismo *Bacillus cereus*; a cepa 8, *Kosakonia cowanii*, assim como as cepas B e D; a cepa 9, *Klebsiella oxytoca*.

As cepas foram numeradas e as consideradas morfologicamente iguais foram identificadas como idênticas (as cepas 5 e 6, por exemplo, foram consideradas a mesma amostra). Seguidamente, foi feito o isolamento de cada uma das 10 cepas em meio líquido (caldo BHI; Figura 13). Foram pesados 120ml de caldo BHI e distribuídos em tubos de ensaio de vidro com tampa rosca (12 ml em cada tubo), para assim serem autoclavados (durante 15 min, a 121°C). Em seguida, os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e as 10 cepas foram inoculadas no fundo nos tubos, com o uso de alças microbiológicas estéreis de 10 µl.

O ágar de caldo BHI viabiliza a preparação de um meio de cultura ideal para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos. Como representado na Figura 18, todos os tubos obtiveram resultados positivos, visto que apresentaram cor turva do caldo BHI, indicando a existência de crescimento bacteriano.

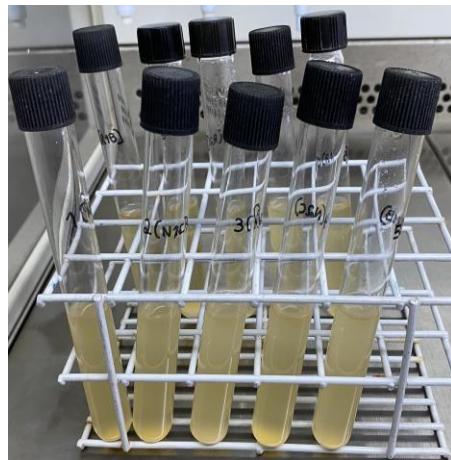


Figura 13 – As 10 cepas de microrganismos isolados e crescidos em meio líquido (BHI).

5.2 Testes de inibição do crescimento microbiano

As cepas isoladas em meio líquido foram plaqueadas somente nos meios BHI e ágar sangue. Não foram plaqueadas em Sabouraud Dextrose porque na etapa de semeadura das amostras de bebida não houve crescimento de microrganismos neste meio. Dessa maneira, os potenciais conservantes naturais foram testados em cada cepa individualmente, nos dois meios de cultura.

As inibições foram ranqueadas em ordem crescente, da seguinte maneira:

(+) - pequena inibição;

(++) - média inibição;

(+++) - alta inibição.

As inibições pequenas, caracterizadas como (+), tinham como valores de diâmetro de inibição de crescimento as medições entre 7 mm e 9 mm. As inibições médias, caracterizadas como (++) , tinham como valores as medições entre 10 mm e 12 mm. Já as inibições altas, caracterizadas como (+++), tinham como valores as medições acima de 13 mm (Figura 14). Os poços possuíam 6 mm como valor de diâmetro.



Figura 14 – Halos formados e ranqueamento em 3 tipos diferentes. (A) O número 1 representa a inibição pequena de *Kosakonia cowanii* isolada do refresco de laranja, frente ao ácido p-anísico na concentração de 0,1 ppm. (B) O número 2 mostra a inibição média de *Bacillus cereus* no refresco de laranja com o emprego da microalga *Spirulina maxima*. (C) Os números 3 e 4 representam, respectivamente, o levulinato de butila na concentração de 1 ppm e o levulinato de cálcio na concentração de 0,1 ppm e seus potenciais de gerar inibições altas em *Staphylococcus epidermidis* presente no refresco de laranja.

Foram criadas tabelas onde os resultados puderam ser comparados entre si. Conforme apresentado na Tabela 2, todas as cinco microalgas foram capazes de inibir o microrganismo *Kosakonia cowanii* presente no néctar, uma vez que houve formação de halos de inibição ao redor dos poços nas placas de meio BHI. O ácido p-anísico, nas suas três concentrações (0,1, 1 e 5 ppm), formou halos de inibição nas placas onde o microrganismo *Staphylococcus epidermidis* foi semeado.

Tabela 2 - Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio BHI (parte 1).

	Medição dos halos/poço (mm) - MEIO BHI								
	C. sp	C. vulg	Hom.	S. max	S. obliq.	AA 0,1	AA 1	AA 5	
N1B (não identificado)	-	-	-	-	-	-	-	-	9/6
N1C (<i>K. cowanii</i>)	11/6	10/6	13/6	7/6	8/6	-	-	-	-
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	-	-	9/6	-	-	13/6	8/6	10/6	
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	-	-	-	-	-	10/6	-	9/6	
R1B (não identificado)	11/6	-	-	9/6	-	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 1 = meio BHI; A, B, C = triplicata; C. sp = *Chlorella* sp; C. vulg = *Chlorella vulgaris*; Hom. = *Haematococcus pluvialis*; S. max = *Spirulina maxima*; S. obliq. = *Scenedesmus obliquus*; AA 0,1 = ácido p-anísico 0,1 ppm; AA 1 = ácido p-anísico 1 ppm; AA 5 = ácido p-anísico 5 ppm.

A Tabela 3 exibe que o levulinato de butila propiciou a formação de halo de inibição contra *Staphylococcus epidermidis*. Além disso, o levulinato de cálcio e o ácido levulínico também mostram resultados contra o microrganismo citado anteriormente.

Tabela 3 - Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio BHI (parte 2).

	Medição dos halos/poço (mm) - MEIO BHI							
	LB 0.5	LB 1	LB 50	LC 0.1	LC 5	AL 1	AL 5	AL 50
N1B (não identificado)	-	-	-	-	-	-	-	-
N1C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	9/6	10/6	-	-	10/6	-	9/6	-
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	-	14/6	10/6	13/6	10/6	-	9/6	9/6
R1B (não identificado)	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 1 = meio BHI; A, B, C = triplicata; LB 0,5 = levulinato de butila 0,5 ppm; LB 1 = levulinato de butila 1 ppm; LB 50 = levulinato de butila 50 ppm; LC 0,1 = levulinato de cálcio 0,1 ppm; LC 5 = levulinato de cálcio 5 ppm; AL 1 = ácido levulínico 1 ppm; AL 5 = ácido levulínico 5 ppm; AL 50 = ácido levulínico 50 ppm.

De acordo com a Tabela 4, todas as cinco microalgas promoveram a formação de halos nas placas de ágar sangue onde *Bacillus cereus* foi semeado. *Chlorella sp* e *Spirulina maxima* foram capazes de inibir *Klebsiella variicola*. *Spirulina maxima* atingiu seu maior halo de inibição (17 mm) contra *Kosakonia cowanii*. Ademais, o ácido p-anísico também pôde estimular halos de inibição nas placas contendo os microrganismos *Kosakonia cowanii* e *Bacillus cereus*.

Tabela 4 - Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio ágar sangue (parte 1).

	Medição dos halos/poço (mm) - MEIO SANGUE							
	C. sp	C. vulg	Hom.	S. max	S. obliq.	AA 0.1	AA 1	AA 5
N2A (<i>K. variicola</i>)	14/6	-	-	10/6	-	-	-	-
N2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	17/6	11/6	-	9/6	-
R2C (<i>B. cereus</i>)	13/6	8/6	8/6	10/6	11/6	-	8/6	10/6
R2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	-	-	8/6	11/6	-
R2C (<i>K. oxytoca</i>)	-	-	-	8/6	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 2 = meio sangue; A, B, C = triplicata; C. sp = *Chlorella sp*; C. vulg = *Chlorella vulgaris*; Hom. = *Haematococcus pluvialis*; S. max = *Spirulina maxima*; S. obliq. = *Scenedemus obliquos*; AA 0,1 = ácido P-anísico 0,1 ppm; AA 1 = ácido P-anísico 1 ppm; AA 5 = ácido P-anísico 5 ppm.

Já a Tabela 5 expressa que o levulinato de butila, na concentração de 1 ppm, alcançou seu maior halo de inibição (16 mm) contra *B. cereus*. Levulinato de cálcio provocou halos de inibição nas placas dos microrganismos *Klebsiella variicola*, *Kosakonia cowanii* e *Klebsiella oxytoca*, respectivamente. E o ácido levulínico teve sua maior e melhor efetividade na placa do microrganismo *Kosakonia cowanii*, com halo no tamanho de 17 mm.

Tabela 5 - Medição, em milímetros, respectivamente dos halos formados e dos poços nas placas de meio ágar sangue (parte 2).

	Medição dos halos/poço (mm) - MEIO SANGUE							
	LB 0.5	LB 1	LB 50	LC 0.1	LC 5	AL 1	AL 5	AL 50
N2A (<i>K. variicola</i>)	-	-	-	-	10/6	-	8/6	-
N2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	10/6	-	-	17/6	-
R2C (<i>B. cereus</i>)	-	16/6	8/6	-	-	10/6	-	-
R2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	-	-	-	-	12/6
R2C (<i>K. oxytoca</i>)	8/6	-	-	15/6	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 2 = meio sangue; A, B, C = triplicata; LB 0,5 = levulinato de butila 0,5 ppm; LB 1 = levulinato de butila 1 ppm; LB 50 = levulinato de butila 50 ppm; LC 0,1 = levulinato de cálcio 0,1 ppm; LC 5 = levulinato de cálcio 5 ppm; AL 1 = ácido levulínico 1 ppm; AL 5 = ácido levulínico 5 ppm; AL 50 = ácido levulínico 50 ppm.

As comparações feitas entre os resultados revelam que *Chlorella* sp e *Spirulina maxima* (Tabelas 6 e 8) foram capazes de formar halos de inibição numa frequência maior. *Chlorella* sp teve uma alta inibição (+++) contra os microrganismos 3 e 7 (*Klebsiella variicola* e *Bacillus cereus*, respectivamente), e *Spirulina maxima* teve uma alta inibição (+++) contra o microrganismo 4 (*Kosakonia cowanii*). O ácido p-anísico e o ácido levulínico (Tabelas 6, 7, 8, 9), nas concentrações de 5 ppm, apresentaram uma regularidade significativa em termos de eficiência na formação de halos de inibição. Portanto, os resultados considerados mais expressivos de inibição do crescimento bacteriano foram obtidos frente a: 100 ppm dos extratos aquosos de *Spirulina maxima* e *Chlorella* sp.; 5 ppm da solução aquosa de ácido p-anísico; e 5 ppm da solução aquosa de ácido levulínico.

Tabela 6 - Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio BHI (parte 1).

PLACAS MEIO BHI	C. sp	C. vulg	Hom.	S. max	S. obliq.	AA 0.1	AA 1	AA 5
N1B (não identificado)	-	-	-	-	-	-	-	+
N1C (<i>K. cowanii</i>)	++	++	+++	+	+	-	-	-
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	-	-	+	-	-	+++	+	++
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	-	-	-	-	-	++	-	+
R1B (não identificado)	++	-	-	+	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 1 = meio BHI; A, B, C = triplicata; (1), (2), (5), (6), (10) = microrganismos; C. sp = *Chlorella* sp; C. vulg = *Chlorella vulgaris*; Hom. = *Haematococcus pluvialis*; S. max = *Spirulina maxima*; S. obliq. = *Scenedemus obliquos*; AA 0,1 = ácido P-anísico 0,1 ppm; AA 1 = ácido P-anísico 1 ppm; AA 5 = ácido P-anísico 5 ppm.

Tabela 7 - Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio BHI (parte 2).

PLACAS MEIO BHI	LB 0,5	LB 1	LB 50	LC 0,1	LC 5	AL 1	AL 5	AL 50
N1B (não identificado)	-	-	-	-	-	-	-	-
N1C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	+	++	-	-	++	-	+	-
R1B (<i>S. epidermidis</i>)	-	+++	++	+++	++	-	+	+
R1B (não identificado)	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 1 = meio BHI; A, B, C = triplicata; (1), (2), (5), (6), (10) = microrganismos; LB 0,5 = levulinato de butila 0,5 ppm; LB 1 = levulinato de butila 1 ppm; LB 50 = levulinato de butila 50 ppm; LC 0,1 = levulinato de cálcio 0,1 ppm; LC 5 = levulinato de cálcio 5 ppm; AL 1 = ácido levulínico 1 ppm; AL 5 = ácido levulínico 5 ppm; AL 50 = ácido levulínico 50 ppm.

Tabela 8 - Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio ágar sangue (parte 1).

PLACAS MEIO SANGUE	C. sp	C. vulg	Hom.	S. max	S. obliq.	AA 0,1	AA 1	AA 5
N2A (<i>K. variicola</i>)	+++	-	-	++	-	-	-	-
N2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	+++	++	-	+	-
R2C (<i>B. cereus</i>)	+++	+	+	++	++	-	+	++
R2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	-	-	+	++	-
R2C (<i>K. oxytoca</i>)	-	-	-	+	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 2 = meio sangue; A, B, C = triplicata; (3), (4), (7), (8), (9) = microrganismos; C. sp = *Chlorella* sp; C. vulg = *Chlorella vulgaris*; Hom. = *Haematococcus pluvialis*; S. max = *Spirulina maxima*; S. obliq. = *Scenedemus obliquus*; AA 0,1 = ácido P-anísico 0,1 ppm; AA 1 = ácido P-anísico 1 ppm; AA 5 = ácido P-anísico 5 ppm.

Tabela 9 - Comparação dos resultados de halo de inibição formados nas placas de meio ágar sangue (parte 2).

PLACAS MEIO SANGUE	LB 0,5	LB 1	LB 50	LC 0,1	LC 5	AL 1	AL 5	AL 50
N2A (<i>K. variicola</i>)	-	-	-	-	++	-	+	-
N2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	++	-	-	+++	-
R2C (<i>B. cereus</i>)	-	+++	+	-	-	++	-	-
R2C (<i>K. cowanii</i>)	-	-	-	-	-	-	-	++
R2C (<i>K. oxytoca</i>)	+	-	-	+++	-	-	-	-

Legenda: N = néctar; R = refresco; 2 = meio sangue; A, B, C = triplicata; (3), (4), (7), (8), (9) = microrganismos; LB 0,5 = levulinato de butila 0,5 ppm; LB 1 = levulinato de butila 1 ppm; LB 50 = levulinato de butila 50 ppm; LC 0,1 = levulinato de cálcio 0,1 ppm; LC 5 = levulinato de cálcio 5 ppm; AL 1 = ácido levulínico 1 ppm; AL 5 = ácido levulínico 5 ppm; AL 50 = ácido levulínico 50 ppm.

Também foi construído um ranking de posição em termos de desempenho dos agentes microbianos mais resistentes às microalgas e às demais substâncias teste (ácido levulínico, ácido p-anísico, levulinato de butila e levulinato de cálcio), onde foi descrita a performance de cada microrganismo:

Tabela 10 – Ranking dos microrganismos mais resistentes frente ao uso dos conservantes em teste e suas respectivas atuações.

Ranking dos microrganismos mais resistentes aos conservantes em teste	Desempenho - conservantes capazes de inibir
1. <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Spirulina maxima</i> ; levulinato de butila (0,5 ppm); levulinato de cálcio (0,1 ppm - inibição alta)
2. <i>Klebsiella variicola</i>	<i>Chlorella</i> sp (inibição alta); <i>Spirulina maxima</i> ; levulinato de cálcio (5 ppm); ácido levuliníco (5 ppm)
3. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i> ; inibido pelo ácido p-anísico em todas as concentrações; levulinato de butila (1 ppm - inibição alta) e levulinato de butila (50 ppm); levulinato de cálcio (0,1 ppm - inibição alta) e levulinato de cálcio (5 ppm); ácido levuliníco (5 ppm, 50 ppm)
4. <i>Kosakonia cowanii</i>	Todas as 5 microalgas (inibição alta - <i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Spirulina maxima</i>); levulinato de cálcio (0,1 ppm); ácido levuliníco (5 ppm - inibição alta); ácido levuliníco (50 ppm)
5. <i>Bacillus cereus</i>	Todas as 5 microalgas (inibição alta - <i>Chlorella</i> sp.; ácido p-anísico (1 ppm, 5 ppm); levulinato de butila (1 ppm - inibição alta); ácido levuliníco (1 ppm))

5.3 Matriz de combinação entre agentes microbianos identificados

A partir da escolha dos melhores resultados dos testes de inibição do crescimento microbiano, foi feita uma combinação dos conservantes naturais em forma de matriz para novos testes nos refrescos e néctares de laranja, consoante à figura abaixo:

SM	Ch	AL	AA		
SM+Ch	SM+AL	SM+AA	Ch+AL	Ch+AA	AL+AA
SM+Ch+AL	SM+Ch+AA	SM+AL+AA	Ch+AL+AA		
SM+Ch+AL+AA					

Figura 15 - Construção da matriz combinatória.

Legenda: SM = *Spirulina maxima*; Ch = *Chlorella* sp.; AL = ácido levuliníco; AA = ácido p-anísico.

Foram utilizadas as concentrações de 100 ppm dos extratos aquosos de *Spirulina maxima* e *Chlorella* sp, 5 ppm da solução aquosa de ácido p-anísico e 5 ppm da solução aquosa de ácido levuliníco. Foram desenvolvidas 15 combinações entre os conservantes, inclusive a junção de todos os conservantes em um mesmo protótipo (formação de um coquetel).

5.4 Técnica de Inoculação por Plaqueamento – Filtração por membrana

As contagens foram realizadas imediatamente após o período de incubação das placas (48h). As colônias microbianas foram contadas com o auxílio de contador de colônias individuais, para potencializar a eficiência do trabalho. Para cada filtração de membrana foi utilizado o fator de diluição 1:10, logo, foi despejado no filtro uma solução de 10 ml da bebida + 90 ml de água mineral. Depois, este fator de diluição foi corrigido na expressão dos resultados.

Além disso, para alcançar resultado mais seguro e confiável, a filtração por membrana de cada amostra foi executada em duplicata. Dessa maneira, o resultado de cada bebida foi a média da contagem das duas placas. Portanto, as tabelas, a seguir, apresentam os resultados já com a média feita das duplicatas.

Tabela 11 - Contagem de UFC/ml nas bebidas com conservantes industriais, nas bebidas sem conservantes, e nas bebidas com conservantes em teste.

Coquetéis									
	Análise	Padrão (Benzoato/Sorbato)	Sem conserv.	SM	Ch	AA	AL	SM + Ch	SM + AL
REFRESCO	BHI	100 / 102	190	300+	101	45	69	300+	131
REFRESCO	Sangue	136 / 123	300+	81	63	100	76	300+	160
NÉCTAR	BHI	145 / 134	240	81	24	67	43	300+	200
NÉCTAR	Sangue	150 / 166	255	110	85	57	61	300+	63

Legenda: SM = *Spirulina maxima*; Ch = *Chlorella* sp; AA = ácido p-anísico; AL = ácido levulínico; SM + Ch = *Spirulina maxima* + *Chlorella* sp; SM + AL = *Spirulina maxima* + ácido levulínico.

Tabela 12 - Contagem de UFC/ml nas bebidas com conservantes em teste (coquetéis de refrescos e néctares).

Coquetéis										
	Análise	SM + AA	Ch + AL	Ch + AA	AL + AA	SM + Ch + AL	SM + AL + AA	SM + Ch + AA	Ch + AL + AA	SM + Ch + AL + AA
REFRESCO	BHI	99	300+	300+	84	202	160	300+	166	300+
REFRESCO	Sangue	92	300+	300+	118	241	228	300+	271	67
NÉCTAR	BHI	40	300+	300+	256	256	227	300+	252	300+
NÉCTAR	Sangue	38	300+	41	300+	300+	300+	300+	300+	300+

Legenda: SM + AA = *Spirulina maxima* + ácido p-anísico; Ch + AL = *Chlorella* sp + ácido levulínico; Ch + AA = *Chlorella* sp + ácido p-anísico; AL + AA = ácido levulínico + ácido p-anísico; SM + Ch + AL = *Spirulina maxima* + *Chlorella* sp + ácido levulínico; SM + AL + AA = *Spirulina maxima* + ácido levulínico + ácido p-anísico; SM + Ch + AA = *Spirulina maxima* + *Chlorella* sp + ácido p-anísico; Ch + AL + AA = *Chlorella* sp + ácido levulínico + ácido p-anísico; SM + Ch + AL + AA = *Spirulina maxima* + *Chlorella* sp + ácido levulínico + ácido p-anísico.

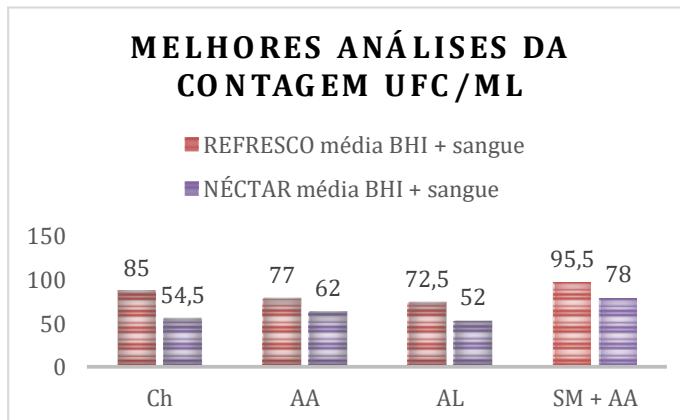
Posterior às análises de cada bebida (Tabelas 11 e 12), foi ponderado que as amostras contendo separadamente *Chlorella* sp, ácido p-anísico, ácido levulínico e amostras contendo o coquetel de *Spirulina maxima* + ácido p-anísico apresentaram os melhores resultados (Tabela 13), uma vez que foram as 4 amostras com as menores contagens de UFC/mL.

Tabela 13 - Resultados mais satisfatórios na contagem de UFC/ml.

Melhores coquetéis					
	Análise	Ch	AA	AL	SM + AA
REFRESCO	BHI	101	45	69	99
REFRESCO	Sangue	63	100	76	92
NÉCTAR	BHI	24	67	43	40
NÉCTAR	Sangue	85	57	61	38

Legenda: SM = Ch = *Chlorella* sp; AA = ácido p-anísico; AL = ácido levulínico; SM + AA = *Spirulina maxima* + ácido p-anísico.

Na presente pesquisa foi possível fazer um ranking de posição dos melhores conservantes das bebidas em teste, a partir da média dos valores da contagem de UFC/ml presentes no refresco e néctar (Figura 16). Ácido levulínico ocupou o primeiro lugar, com uma média de contaminação de 62,2 por placa. Ácido p-anísico, o segundo lugar (69,5). *Chlorella* sp, o terceiro (69,75). E o coquetel de *Spirulina maxima* + ácido p-anísico atingiu o quarto lugar (86,75).

**Figura 16** - Resultados mais satisfatórios na contagem de UFC/ml.

Legenda: SM = *Spirulina maxima*; Ch = *Chlorella* sp; AA = ácido p-anísico; AL = ácido levulínico; SM + AA = *Spirulina maxima* + ácido p-anísico.

5.5 Acompanhamento das cepas microbianas nas bebidas

Depois de 15 dias da produção das 4 bebidas adicionadas com os coquetéis com as menores contagens de UFC/ml, tais amostras que estavam armazenadas na geladeira foram semeadas, em duplicata, em placas de meio ágar sangue e meio ágar BHI, e após 48h incubadas em estufa bacteriológica, foram levadas ao MALDI-TOF MS para ser realizada a identificação dos microrganismos existentes (Tabela 14).

Tabela 14 - Microrganismos identificados no MALDI-TOF MS.

Resultados MALDI-TOF MS		
CEPA	MICRORGANISMO	BEBIDA
1	<i>Bacillus pumilus</i>	refresco e néctar com ácido p-anísico refresco e néctar com <i>Spirulina maxima</i> + ácido p-anísico
2	<i>Bacillus subtilis</i>	refresco e néctar com ácido levulínico refresco e néctar com <i>Chlorella sp</i>

Não houve mais crescimento de *Kosakonia cowanii*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus* nos néctares e refrescos, o que indica que os coquetéis dos conservantes testes foram bem-sucedidos na inibição da multiplicação destes gêneros microbianos. No entanto, foram reconhecidas duas espécies diferentes do gênero *Bacillus* (Tabela 14), espécies estas que são menos reconhecidas quanto as suas características de patogenicidade e não existem descritos na literatura registros de surtos no Brasil.

6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, observou-se que a utilização de microalgas, assim como de ácido levulínico, ácido p-anísico, levulinato de butila e levulinato de cálcio, como conservantes naturais é uma temática inovadora, uma vez que não foram encontrados registros na literatura de testes para esse objetivo no ramo de bebidas da indústria alimentícia. Embora as microalgas apresentem potencial biotecnológico relevante e sua biomassa possa ser empregada na produção de alimentos, compostos bioativos, biorremediação, biocombustíveis, cosméticos e como biofertilizantes (FAPESP, 2014), suas aplicações como conservantes naturais não é amplamente difundida e explorada na literatura, abrindo um precedente de oportunidades que corroboram para a temática estudada.

Adicionalmente, o ácido levulínico, por ser um composto multifuncional e de eficiente atuação na inibição de crescimentos microbianos indesejados, pode ser aplicado em inúmeros setores industriais (Manzer, 2014), como na composição de perfumes (cosmético), na produção de solventes e pesticidas (produtos químicos) e, também, na produção de café ou de cacau (indústria de alimentos). O ácido p-anísico é tipicamente usado nas especiarias e nos preservativos, possui propriedades antissépticas, podendo ser um ingrediente ativo contra germes específicos em produtos cosméticos. Portanto, confirmou-se como extensa a aplicabilidade dos levulinatos e ácido p-anísico no mundo industrial, porém, nenhuma dessas substâncias foram ponderadas e otimizadas com funções de conservantes alimentares, de cunho natural.

A explicação de determinados microrganismos identificados neste trabalho não sofrerem efeito dos conservantes estudados deve-se à resistência relativa de cada grupo microbiano. A resistência bacteriana está associada à variação genética, que é determinada por 2 causas: mutação (alteração lenta e espontânea no material genético transmitido aos descendentes, resultando em bactérias que apresentam características genéticas que as tornam distintas das demais) e recombinação (substituição de genes homólogos, provenientes de uma célula doadora, em uma célula receptora). A resistência aos agentes microbianos pode ser elucidada por um ou mais mecanismos gerais: impermeabilidade, que é a redução da concentração da droga na célula; modificação da molécula alvo que evita a ligação da droga à bactéria; e inativação enzimática da droga (Auer, Weibel, 2017). Esses mecanismos são provenientes das diferenças essenciais entre os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Alguns agentes antimicrobianos primeiramente precisam aderir à superfície da parede celular para conseguirem atuar, e com isso, na grande maioria das vezes, as células sensíveis fixam maior quantidade de antibiótico do que as resistentes. O agente antimicrobiano deve conseguir penetrar através da parede celular para atingir a estrutura sobre a qual irá atuar. A maioria deles necessita também atravessar a membrana citoplasmática. Logo, há uma diferença quanto a capacidade de penetração dos antibióticos em relação às bactérias Gram positivas e Gram negativas (LIX, PLÉSIAT P, NIKAIDO H., 2015).

Nas bactérias Gram-negativas, a parede celular é composta por uma camada de peptidioglicano e três outros componentes que a envolvem externamente: lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo (LPS). O peptidioglicano é responsável pela forma das células e proteção do citoplasma frente às diferenças de pressão osmótica entre os meios externo e interno, proporcionando rigidez ao corpo bacteriano (Burnet & Schuster, 1982). O peptidioglicano está presente no espaço periplasmático, situado entre a membrana citoplasmática (interna) e a membrana externa, onde também estão localizadas enzimas hidrolíticas (fosfatases, nucleases, proteases e outras). Essas enzimas viabilizam a nutrição bacteriana e proteínas de ligação que participam da captação de açúcares e aminoácidos a partir do meio, inativando certos antibióticos (Nisengard & Newman, 1994). A membrana externa constitui uma barreira molecular, prevenindo ou dificultando a perda de proteínas periplasmáticas e o acesso de enzimas hidrolíticas e certos antibióticos ao peptidioglicano. O LPS compreende o lipídio A (endotoxina) que é um glicofosfolipídeo cujo papel biológico consiste na participação nos mecanismos de patogenicidade da célula bacteriana (Burnet & Schuster, 1982; Nisengard & Newman, 1994).

Em contrapartida, os organismos Gram-positivos possuem uma parede celular espessa envolvendo a membrana citoplasmática que é composta por ácidos teicoicos e peptidioglicanos. Em relação aos fatores de ataque, as células Gram-positivas e Gram-negativas são retratadas por graus diferentes de virulência. As bactérias Gram-negativas são formadas por uma endotoxina, o LPS, que lhes concede a propriedade de patogenicidade, enquanto nas bactérias Gram-positivas a exotoxina, composta pelo ácido lipoteicoico, tem a aderência como atributo principal (ABCMED, 2014).

Portanto, a definição do microrganismo como gram-positivo ou gram-negativo determina a eficácia dos agentes físicos e químicos utilizados para eliminar, controlar ou aumentar o crescimento das bactérias. Dessa maneira, os microrganismos *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella variicola* (Gram-negativos) constituem os microrganismos mais resistentes à atuação

de inibição de crescimento dos conservantes testes, enquanto *Bacillus cereus* (Gram-positivo) possui uma maior sensibilidade aos conservantes e, portanto, consegue ser inibido mais facilmente.

As paredes mais complexas das bactérias Gram-negativas as tornam mais resistentes e dificultam que os antibióticos e outros agentes microbianos adentrem em seu interior (Wenzler, 2016).

Embora as bactérias Gram-negativas tenham um perfil mais significativo de resistência à antimicrobianos, as Gram-positivas também apresentam perfis de resistência amplamente difundidos na literatura. O gênero *Staphylococcus* (Gram-positivo), encontrado neste trabalho, é responsável por diversas infecções nosocomiais que atinge vários órgãos. Dessa forma, o uso incorreto de antimicrobianos corrobora para um perfil de resistência bacteriana que origina grandes impactos na saúde da população (Serafim et al., 2019). Ainda segundo Serafim et al. (2019), há uma resistência verificada no *S. epidermidis* à penicilina e ampicilina (100%). A resistência cada vez mais comum às penicilinas, ocasionando surtos de infecções no âmbito hospitalar, deve-se pela capacidade do microrganismo produzir a enzima betalactamase que inativa o anel betalactâmico da penicilina, através de hidrólise (Carneiro et al., 2008).

De acordo com Oliveira et al. (2002), amostras que possuem até 105 UFC/g não causam problemas ao consumidor. Entretanto, Mossel & Garcia (1975) declararam que a produção mínima de enterotoxina estafilocócica em um alimento acontece quando existe condições favoráveis de temperatura e pH para a multiplicação dos estafilococos até contagens de 105 UFC/g de alimento. De acordo com Bergdoll (1995), o fato de as espécies não produtoras de coagulase contaminarem e se propagarem nos alimentos pode ser fundamentado pelo fato de tanto o homem como os animais serem portadores usuais destas estirpes. Embora haja controvérsias na literatura, é sabido que manipuladores de alimentos e bebidas, sem o devido controle higiênico-sanitário, podem atuar como reservatório de *Staphylococcus* sp, provocando contaminação por esses microrganismos (Souza et al., 2000).

Adicionalmente, a bactéria Gram-positiva conhecida como *Bacillus cereus*, identificada nesta pesquisa, também é resistente à penicilina. No entanto, apesar de existirem relatos de surtos e casos esporádicos deste microrganismo, *B. cereus* geralmente manifesta-se em curta duração e é pouco severo. A dose letal média (DL50) para a toxina letal das cepas varia em torno de 106 UFC/mL, calculada pelo método de Reed-Muench (Macena, 1997). Esses resultados corroboram com a assertiva de que a intoxicação alimentar por *Bacillus cereus* pode

ocorrer apenas quando o alimento contém uma quantidade grande de células viáveis (acima de 10⁶ UFC/g).

7 CONCLUSÕES

Os meios de cultura propícios para crescimento dos microrganismos nas bebidas de laranja foram o ágar BHI e o ágar sangue. As microalgas escolhidas da coleção do LEAF foram: *Spirulina maxima*, *Chlorella sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* e *Scenedesmus obliquus*. A caracterização de 5 gêneros microbianos no néctar e no refresco, através do MALDI-TOF MS, associada à comparação, de forma qualitativa, dos halos de inibição formados entre os diferentes microrganismos na presença dos conservantes naturais, possibilitaram a revelação dos melhores conservantes em teste: as microalgas *Chlorella sp* e *Spirulina maxima*, ácido p-anísico e ácido levulínico.

A análise conjunta dos dados demonstra que o planejamento de investigação do potencial antimicrobiano de conservantes em teste foi bem-sucedido uma vez que foram definidas as concentrações ideais de extratos de duas espécies de microalgas, de ácido levulínico e de ácido p-anísico, capazes de reduzir显著mente o crescimento de microrganismos em duas das bebidas mais consumidas nacionalmente: 100 ppm, 5 ppm e 5 ppm, respectivamente.

A redução significativa da contagem de Unidades Formadoras de Colônias nas amostras pode ser evidenciada e considerada ao comparar com os resultados da contagem microbiana dos padrões da pesquisa, isto é, dos conservantes benzoato e sorbato amplamente utilizados nas grandes indústrias alimentícias. Tal esquema expressou uma classificação em termos de melhores desempenhos, que são as bebidas compostas por ácido levulínico, ácido p-anísico, *Chlorella sp*, e integração de *Spirulina maxima* com ácido p-anísico.

É presumido que o seguimento da pesquisa busque por demais experimentos utilizando diferentes fatores de diluição na técnica de Filtração em Membrana, para assim comparar com os resultados da contagem de UFC/ml provenientes do fator de diluição 1:10, escolhido neste trabalho. Paralelo a isso, poderia ser realizado um acompanhamento, ao longo do tempo, das cepas microbianas nas bebidas armazenadas em estufa com aceleração forçada, para analisar o tempo de prateleira. Também seria ideal uma avaliação, mediante modelos matemáticos, do grau de resistência dos grupos microbianos identificados de acordo com a taxa de degradação/destruição dos microrganismos; além disso, uma investigação do comportamento de redução da população microbiana face a cada conservante através de expressões que ajudem a elucidar o comportamento cinético de decaimento ou inibição acerca da constante de proporcionalidade (K) de destruição, bem como quais são os parâmetros que exercem maior influência, como pH, temperatura e tempo de ação dos conservantes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedin, R.M.A., Taha, H.M., 2008. 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 1, 22–31.
- ABIR, Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não alcoólicas Del Valle 100% suco, néctar ou refresco? Lago Sul, Brasília, DF, 7 de outubro de 2016. Disponível em <<https://abir.org.br/2016/10/07>> Acesso em 07/04/2022.
- Adiba, B.D., Salem, B.; Nabil, S.; Absdelhakim, M, (2011). Preliminary characterization of food tablets from date (*Phoenix dactylifera* L.) and spirulina (*Spirulina sp.*) powders. Powder Technol., v. 208, n. 3, p. 725-730.
- Aganovic, K., Grauwet, T., Siemer, C., Toepfl, S., Heinz, V., Hendrickx, M., Van Moey, A., (2016). Headspace fingerprinting and sensory evaluation to discriminate between traditional and alternative pasteurization of watermelon juice. Eur. Food Res. Technology 242, 783 - 803.
- Amaral, E.T. Aproveitamento de glicerol como suplemento nutricional no desenvolvimento de microalgas: prospecção para obtenção de biomassa e lipídios. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental), Universidade de Santa Cruz do Sul, 2017.
- Andrade, M.D.R.; Costa, J.A.V. (2008). Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. Ciência e agrotecnologia, v. 32, n. 5, p. 1551-1556.
- ANVISA - Aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia Publicado em 19/10/2020 09h58 Atualizado em 01/10/2021 13h55 Disponível em <http://antigo.anvisa.gov.br/en_US/alimentos/aditivos-alimentares> Acesso em 05/03/2022.
- Aquaculture Brasil, 2017. Sistemas de Cultivo de Microalgas – Parte I - Colunas - Aquaculture Brasil - O maior portal brasileiro sobre aquicultura.
- Aquaculture Brasil (janeiro/fevereiro, 2018): Sistemas de Cultivo de Microalgas – Parte III - Colunas - Aquaculture Brasil - O maior portal brasileiro sobre aquicultura.
- Azeredo, V. B. S. (2012.) Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético), Universidade Federal do Rio de Janeiro. 171f. Disponível em <http://antigo.ppe.ufrj.br/ppe/production/tesis/vinicius_barbosa.pdf> Acesso em 05/03/2022.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K.,(2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6, 71–79.
- Becker, W., Richmond A., ed.2004 Microalgae in human and animal nutrition. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.
- Belay et al. (1993) - Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H., 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. Journal of Applied Phycology 5, 235–241.
- Belay, 2008 - *Spirulina* (*Arthospira*): production and quality assurance. In: Gershwin, M.E., Belay, A. (Eds.), *Spirulina in Human Nutrition and Health*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1–25.
- Berto, D, 2003. Panorama do Mercado de bebidas. Food Ingredients, n. 23, p. 32-33, mar./abr.
- BNDES, 2014 - O setor de bebidas no Brasil_P_.pdf (bndes.gov.br) Acesso em 02/09/2021.
- BNDES Setorial - classificação da indústria de bebidas em segmentos - BS 23 Panorama do Setor de Bebidas no Brasil_P.pdf Disponível em <des.gov.br> Acesso em 02/09/2021.
- BDNES Setorial, 2006 BS 23 Panorama do Setor de Bebidas no Brasil_P.pdf (<http://bndes.gov.br>) Rio de Janeiro Acesso em 02/09/2021.
- Borowitzka, M. A. 1999 Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of biotechnology, v. 70, n. 1-3, p. 313-321,
- BRASIL. Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da Comissão Intersetorial de Bebidas e dá outras providências. Brasília: Presidência da República, casa Civil, Art. 5º da Lei nº 8918,1994. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/18918.html Acesso em 20/02/2022.

BRASIL Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997- Ministério da Saúde, Marta; Nóbrega; Martinez. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico Aditivos Alimentares . Disponível em em https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0540_27_10_1997.html Acesso em 20/02/22.

BRASIL Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Marta Nóbrega Martinez. regulamento técnico aditivos alimentares.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Transplante – SNT Estatísticas. Brasília. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-orgaos>> Acesso em: 14/03/2022.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 jan. 2001. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-12-de-2-de-janeiro-de-2001.pdf>> 05/03/2022.

Braga, D.H. Manual Regulatório para bebidas não alcoólicas. Universidade Federal de Lavras – MG 2019

Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from microalgae (2010) a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. Renewable and sustainable energy reviews, v. 14, n. 2, p. 557-577.

Budavari, S., Ed., (1989) The Merck Index. 11ª Edição, Merck & Co., Inc., Rahway, Nova Jersey.

Buono et al., 2014 - Buono, S., Langellotti, A.L., Martello, A., Rinna, F., Fogliano, V., 2014. Functional ingredients from microalgae. Food and Function 5, 1669–1685

Cao, X. L; Casey, V; Seaman, S; Tague, B; Becalski, A. Determination of Benzene in soft Drinks and Other Beverages by Isotope Dilution Headspace Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Journal of AOAC International. v 90. n 2. 2007. pp 479-484.

Castenholz, 1989 - Castenholz, R.W., 1989. Subsection III. Order Oscillatoriiales. In: Stanley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1771–1780.

Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J. & Chang, J.S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. Bioresource Technology,102: 71-81

Chisti, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. Richmond, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

Chueca, D., Ramírez, N., Arvizu-Medrano, S. M., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2016. Inactivation of spoiling microorganisms in apple juice by a combination of essential oils' constituents and physical treatments. Food Technol. Int. 22, 389 - 398

Clínica e Laboratorial Standards Institute, 2015 - Microsoft Word - M100S15_revisao finalgisele _2_.doc Disponível em <<http://anvisa.gov.br>> Acesso em 08/05/22.

Desbois, A.P., Mearns-spragg, A., Smith, V.J. 2009. A fatty acid from the diatom Phaeodactylum tricornutum is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Marine Biotechnology 11, 45–52.

Desbois e Smith, 2010 - Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 1629–1642.

Dias, 2017 - Influência de Diferentes Regimes de Cultivo na Produção de Biomassa da Microalga Acutodesmus obliquus em um Sistema Laminar de Cultivo de Algas <http://ufsc.br>

Dumitrel, G.A., Glevitzky et al., 2009 - Glevitzky, M., Perju, D., Popa, M., Studies regarding the use of preservatives on soft drinks stability. Chem. Dull. POLITEHNICA Univ. (Timisoara) 54 (68), 1.

Fellows, P. and Hampton, A. 1992 Small-Scale Food Processing. A Guide to Appropriate Equipment. Intermediate Technology Publications, London, - References - Scientific Research Publishing (scirp.org) 7, 155-156.

Fonseca, 2016 - Fonseca, A. N. da; Pereira, C. Processo Criativo. Maringá - PR.: UniCesumar, (adaptado).

Galbraith e Milter, 1973 - Galbraith, H., Milter, T.B., 1973. Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. Journal of Applied Bacteriology 36, 659–675.

- Ghasemi et al. (2007) - Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S., Morowvat, M.H., 2007. Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran : characterization of antimicrobial activity of Chroococcus dispersus. *Journal of Biological Sciences* 7, 904–910.
- Gladue R 1991 Heterotrophic microalgae production potential for application to aquaculture feeds En Rotifer and Microalgae CuHure Systems The OceanicInst Hawaii 275286 pp
- Grobelaar, J.U., 2003. Quality Control and Assurance: crucial for the sustainability of the applied phycology industry. *Journal of Applied Phycology* 15, 209–215.
- Gould, G.W., 2000. Preservation: past, present and future. *Br. Med. Bull.* 56 (1) 84-96.
- Guilhermino, L., Chasin, A. (2014). Estudo da Formação de Benzeno da Formação de Benzeno de em Bebidas Contendo o Conservante Benzoato de Sódio. *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*, v.1, n.1.
- Halperin et al., 2003 - Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H., 1993. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of Applied Phycology* 5, 235–241.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M. & Danquah, M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1037-1047.
- Heatley, em 1944 - Heatley, N.G., 1944. A method for the assay of penicillin. *The Biochemical Journal* 38, 61–65.
- Henrikson, R. 1994. Microalga Spirulina – Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones Urano, ISBN 84-7953-047-2.
- Heredia-Arroyo, T.; WEI, W.; HU, B. 2016. Oil accumulation via heterotrophic / mixotrophic Chlorella protothecoides. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 162, n. 7, p. 1978-199 2010.
- ICMSF (1996) *Bacillus cereus* . Microorganisms in Foods, vol 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens. Londres, Blackie Academic & Professional: 20-35.
- Índice.eu, Toda a Saúde, Levulinato de cálcio, 2021. Disponível em <<https://www.indice.eu/pt/medicamentos/DCI/levulinato-de-calcio/informacao-geral>> Acesso em 15/03/2022.
- Jorgensen e Ferraro, 2009 - Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J., 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases* 7750, 1749–1755.
- Karkos et al. 2011 Karkos, P.D., Leong, S.C., Karkos, C.D., Sivaji, N., Assimakopoulos, D.A., 2011. Spirulina in clinical practice: evidence-based human applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2011:531053.
- Khoeiy, Z.A., Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., 2012. Fatty acid composition of the microalgae. *Aquaculture International* 20, 41–49.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M., Divanach, P., 2012. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research* 43, 1520–1527.
- Kurihara, H., Goto, Y., Aida, M., Hosokawa, M., Takahashi, K., 1999. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and inhibition of insoluble glucan by free fatty acids obtained from dried *Gloiopeletis furcata*. *Fisheries Science* 65, 129–132.
- Lima, L.; Melo; Filho, A. Bibiano. Tecnologia de bebidas. 2011 Recife: Edufrpe., Rede e-tec. Brasil. Disponível em <https://pronatec.ifpr.edu.br/wp-content/uploads/2013/06/Tecnologia_de_Bebidas.pdf> Acesso em 05/03/2022.
- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 14, n. 1, p. 217-232.
- Mendiola, J.A., Santoyo, S., Cifuentes, A., Reglero, G., Ibáñez, E., Señoráns, F.J..2008. Antimicrobial activity of sub- and supercritical CO₂ extracts of the green alga Dunaliella salina. *Journal of Food Protection* 71, 2138–2143.
- Merchant, R.E., Rice, C.D., Young, H.F., 1990. Dietary Chlorella pyrenoidosa for patients with malignant glioma: effects on immunocompetence, quality of life, and survival. *Phytotherapy Research* 4, 220–231.
- Merchant, R.E., Andre, C.A., 2001. A review of recent clinical trials of the nutritional supplement Chlorella pyrenoidosa in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Alternative Therapies in Health and medicine* 7, 79.

- Miao, X.; Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource technology*, v. 97, v. 6, p. 841-846,
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária- portaria nº 540 do Ministério da Saúde, de 27 de outubro de 1997 Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0540_27_10_1997.html> Acesso em 03/01/2021.
- Mira, V.S. 2015 Desenvolvimento de um Iogurte suplementado com Spirulina platensis: Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Sensorial. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar - Peniche Instituto Politécnico de Leiria. Disponível em <<https://iconline.ipoleiria.pt/bitstream/10400.8/2209/1/Dissertação%20Vanessa%20Mira%20%284130054%29.pdf>> Acesso em 05/03/2022.
- Mitsuda, H., Takehiko, S.,(1960). Studies on the utilization of Chlorella for food. Studies on the nutritive values of cell free algal proteins. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto* 38, 40–58.
- Mitsuda et al. 1977 Mitsuda, H., Nishikawa, Y., Higuchi, M., Nakajima, K., Kawai, F., 1977. Effect of the breaking of Chlorella cells on the digestibility of Chlorella protein. *Eiyo To Shokuryo* 30, 93–98.
- Molina-Cárdenas, C.A., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Lizárraga-Partida, M.L., 2014. Inhibition of pathogenic Vibrio by the microalgae Isochrysis galbana. *Journal of Applied Phycology* 26, 1–9.
- Moraes, M.G.; Miranda, M. Z.; Costa, J.A.V. 2006 Biscoitos de chocolate enriquecidos com Spirulina plágência: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. *Alimentos e Nutrição*, v. 17, n. 3, p. 323-328, .
- Morais, M.G. & Costa, J.A.V. 2008. Bioprocessos para a remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Química Nova*, 31 (5): 1038-1042.
- Murray, P.R. et al.1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed, American Society for Microbiology 1999
- Muller-Feuga, A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* 12, 527–534.
- Neori, A., 2011. ‘Green water’ microalgae: the leading sector in world aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 23, 143–149.
- Neves, M.F., Trombin, V.G., Lopes, F.F., Kalaki, R., & Milan, P. 2011. World consumption of fruit juices, nectars, and still drinks. In: M. F. Neves, & V. G. Trombin (Eds.), *The orange juice business: A Brazilian perspective* .The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. pp. 119-119.
- NICHOLS & BOLD, 1965: NICHOLS, H. W.; BOLD, H. C. *Trichosarcina polymorpha gen. sp. nov.* *Journal of Phycology*, v. 1, n. 1, p. 34-38, 1965.
- Pereira S. L. G.2011 Alteração de Conservantes no Pós-registro e Possíveis Impactos na Qualidade dos Medicamentos Fabricados no Brasil. Universidade Estadual Paulista. Araraquara – SP.
- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A.2017. Thermal treatments for fruit and vegetable Juices and beverages: a literature overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 668-691.
- Polonio, M.; Peres, F.2009. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.
- Escola de Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. 2 Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil
- Ortenzio, Y., T., Amaral G., Almeida, S dos Santos, Oliveira, E. Cristina A. Martins de Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. Disponível em <<http://www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiarevista/article/view/161>> Acesso em 05/03/2022.
- Powell et al.,1961- Powell, R.C., Nevels, E.M., McDowell, M.E., 1961. Algae feeding in humans. *Journal of Nutrition* 75, 7–12
- Pratt, R., Daniels, T.C., Eiler, J.B., Gunnison, J.B., Kumler, W., 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from Chlorella. *Science* 99, 351–352. Proksch, P., Edrada, R.A., Ebel, R., 2002. Drugs from the seas: current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 125–134.

- Pulz, O. 2001 Fotobioreatores: Sistemas de Produção para Microrganismos Fototróficos. *Microbiologia aplicada e Biotecnologia*, 57, 287-293. Disponível em <<https://doi.org/10.1007/s002530100702>> Acesso em 12/12/2021.
- Ramos et al., 2010 - Ramos, A.L., Torello, C.O., Queiroz, M.L.S., 2010. Chlorella vulgaris modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumorbearing mice. *Nutrition and Cancer* 62, 1170–1180.
- Ranken, M. D., Kill, R.C., Baker, C.G.J., 2005. *Food Industries Manual*, 24 td ed. Springer Verlag.
- Raposo, M.F.J., Morais, A.M.B., Morais, R.M.S., 2014a. Bioactivity and applications of polysaccharides from marine microalgae. In: Merillon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Springer, Cham, Switzerland. Disponível em <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_47-1>. Acessado em 12/12/2021
- Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and Probiotics: Are They Functional Foods. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1682-1687.
- Sanabria-ríos et al., 2014 - Sanabria-ríos, D.J., Rivera-torres, Y., Maldonado-Domínguez, G., Domínguez, I., Ríos, C., Díaz, D., Rodríguez, J.W., Altieri-Rivera, J.S., Rios-Olivares, E., Cintron, G., Montano, N., Carballera, N.M., 2014. Antibacterial activity of 2-alkynoic fatty acids against multidrug-resistant bacteria. *Chemistry and Physics of Lipids* 178, 84–91.
- Seetaramaiah et al., 2011; Denyer et al., 2008; Kulkarni et al., 2010; Russell, 1999; Block, 2001; <http://www.edition.cnn.com/HEALTH/indepth.food/additives/atable.html> Acesso em: 5 setembro de 2021
- Introdução de refrigerantes e sucos industrializados na dieta de lactentes que frequentam creches públicas. Silva G.et al; Aguiar, M.; 2015 Revista Paulista de Pediatria, Volume 33, Issue 1, March, Pages 34-41
- Santos, A.O.; Silva, T.C.; Silva, N.C.; Duarte, C.R.; Barroxo, 2017.M.A.S. Impacto da desidratação por micro-ondas nos compostos bioativos da Spirulina platensis. XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica UFSCar – São Carlos – SP 16 a 19 de Jul. de 2017.
- Silva, E.; Melo F.; Soares, J. et al 2019.Conservação de alimentos pelo uso de Aditivos: uma revisão Curitiba, v. 37, n. 2, jul./dez. 2019
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. resolução - rdc nº 8, de 6 de março de 2013
- Singh, A., Nigam, P.S. & Murphy, J.D. 2011. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresource Technology*,102: 26-34
- Skulberg, 2000 - Skulberg, O.M., 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology* 12, 341–348.
- Silva, A. P. F. Et al. Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Nutrição - CONBRAN 2020 - Nutrição na Cadeia de Produção, na na Indústria e no comércio de alimento adequação da rotulagem de iogurtes naturais comercializados em Teresina-pi revista da associação brasileira de nutrição - Rasbran, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 264–423, 2021- Brasil. Disponível em: <https://www.rasbran.com.br/rasbran/article/download/2204/350/6174> Acesso em 05/01/2022.
- Steen e Ashurst, 2006 - Steen, T. D., Ashurst, R. P., 2006. *Carbonate Soft Drinks: Formulation and Manufacture*. Blackwell Publishing Ltd., USA.
- Sutton, 2003 - Sutton, D.A. 2003. Specimen collection, transport, and processing: mycology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C
- Syed et al., 2015 - Syed, S., Arasu, A., Ponnuswamy, I., 2015. The uses of Chlorella vulgaris as antimicrobial agent and as a diet: the presence of bio-active compounds which caters the vitamins, minerals in general. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology* 7, 185–190.
- Takeuchi et al., 1999 - Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443–451.
- Tendencia e de la Peña, 2003 - Tendencia, E.A., de la Peña, M., 2003. Investigation of some components of the greenwater system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture* 218, 115–119.

Terekhova et al., 2009 - Terekhova, V.E., Aizdaicher, N.A., Buzoleva, L.S., Somov, G.P., 2009. Influence of extrametabolites of marine microalgae on the reproduction of the bacterium *Listeria monocytogenes*. Russian Journal of Marine Biology 35, 355–358.

Universidade Federal de Goiás. Pet - bebidas e suas classificações | Pet Acesso em 01/09/2021

Venkatesan, R., Vasagam, K.P.K. & Balasubramanian, T. 2006. Culture of marine microalgae in shrimp farm discharge water: a sustainable approach to reduce the cost production and recovery of nutrients. Journal of Fisheries and Aquatic Science,1(3): 262-269.

Vidal, I. C. D. A. 2016. Estudo da potencialidade de produção de biocombustíveis entre as microalgas Chlorella sp. e Scenedesmus sp. cultivadas em águas residuárias. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande

Volk, R.-B., Mundt, S., 2007. Cytotoxic and non-cytotoxic exometabolites of the cyanobacterium *Nostoc insulare*. Journal of Applied Phycology 19, 55–62

Vonshak, A., Tomaselli, L., 2000. *Arthospira (Spirulina)*: systematics and ecology. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer, Dordrecht, pp. 505–522.

- Walker, R.W.,Goran, M.I., 2015, Laboratory determined sugar content and composition of commercial infant formulas, baby foods and common grocery items targeted to children, Nutrients 7 (7), 5850-5867.

Wikins et al., 1972 - Wikins, T.D., Holdeman, L.V., Abramson, I.J., Moore, W.E., 1972. Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1, 451–459.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology,126: 499-507

Zamalloa, C., Vulsteke, E., Albrecht, J. & Verstraete, W. 2011. Bioresource Technology,102: 1149-1158.