

CECILIA CAROLINE PEREIRA VIEIRA

**BACTERIOCINAS: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA
NA BIOCONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**



**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 Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
ABRIL / 2021**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor Marco Antônio Lemos Miguel e coorientação de Felipe Miceli de Farias

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

436b Vieira, Cecilia Caroline Pereira
 Bacteriocinas: uma alternativa promissora na
 bioconservação de alimentos / Cecilia Caroline
 Pereira Vieira. -- Rio de Janeiro, 2021.
 66 f.

 Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel.
 Coorientador: Felipe Miceli de Farias.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
 Microbiologia e Imunologia, 2021.

 1. Bacteriocinas. 2. Bioconservação de alimentos.
 3. Antimicrobianos naturais. I. Miguel, Marco
 Antônio Lemos, orient. II. de Farias, Felipe Miceli,
 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: Cecilia Caroline Pereira Vieira
 DRE: 117032302

BANCA EXAMINADORA: Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza (Presidente)
 Prof. Mateus Gomes de Godoy
 Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida
 Prof. Leandro Lobo (Suplente)

Título da Monografia: "Bacteriocinas: uma alternativa promissora na bioconservação de alimentos"

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/cmf-ftxs-aof>
 Data e hora de início: 06 de abril de 2021 as 13:00h

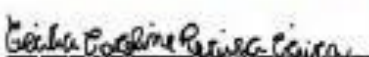
Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. 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, 06 de abril de 2021.

NOTA	Banca Examinadora:
___ 9,5 ___	Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza
___ 9,5 ___	Prof. Mateus Gomes de Godoy
___ 9,5 ___	Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida
_____	Prof. Leandro Lobo


Presidente da banca _____

 Prof. Sergio Eduardo Longo Fracalanza

Aluno: _____

 Cecilia Caroline Pereira Vieira

Orientador: _____

 Prof. Marco Antônio Lemos Miguel / Coorientador: M.Sc. Felipe Mizodi de Farias

Coordenador
 de TCC _____

 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao amor da minha vida, Deus, por me dar força e ânimo todos os dias para vencer e superar qualquer obstáculo. Certamente Ele é o motivo pelo qual busco ser uma pessoa melhor e nunca desistir. Jamais teria concluído qualquer coisa na vida sem seu suporte.

À minha família: minha avó Maria, meu irmão Paulo e meus pais Rejane e Mauro, por estarem presentes em cada momento feliz e de dificuldade da minha jornada. Obrigada por cada gesto de amor e carinho. Em especial, agradeço aos meus pais pelo apoio na escolha do meu curso de graduação e pelo imenso amor que recebi ao longo da vida.

Agradeço ao meu orientador, professor Marco Miguel, pela oportunidade de fazer estágio no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e por me ensinar tanto sobre essa maravilhosa área. Ao meu coorientador Felipe Miceli, pelo auxílio e paciência em cada experimento no laboratório. Ambos são pessoas excepcionais que certamente escolheram a profissão certa, qualquer aluno pode perceber a dedicação que possuem em ensinar e não poderia ser diferente comigo, aprendi muitíssimo e serei eternamente grata pelas suas orientações. É difícil expressar em palavras o impacto positivo de ter feito estágio nesse laboratório e que a orientação dos dois fez na minha vida.

Aos colegas que fiz no Laboratório (Camile, Thais, Letícia e Agnes), em especial ao Antônio que com muita paciência me ajudou incontáveis vezes. A todos os professores da graduação em Microbiologia e Imunologia da UFRJ, sempre solícitos em tirar dúvidas, em dar o melhor de cada um em aulas presenciais e posteriormente remotas. Todos se empenharam para que mesmo durante o período de pandemia seus alunos pudessem ter a chance de continuar a estudar.

Agradeço a FAPERJ e CNPq pelo suporte financeiro para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Cecilia Caroline Pereira Vieira

Bacteriocinas: uma alternativa promissora na bioconservação de alimentos

Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel

Coorientador: Felipe Miceli de Farias

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.

Atualmente, existe um crescente interesse das políticas públicas de alimentação e dos consumidores por alimentos sem conservantes químicos e minimamente processados. Contudo, a fabricação de produtos alimentícios com quantidade reduzida ou nula de conservantes químicos poderia resultar na redução do tempo de vida do produto e numa maior chance de proliferação de microrganismos deterioradores e de patógenos alimentares. Há, dessa forma, uma necessidade de utilização de outras metodologias para a conservação de alimentos, métodos que preferencialmente não alterem as características organolépticas do produto, tendo como objetivo, a manutenção de sua aceitabilidade pelo consumidor, evitando assim perdas econômicas. Uma maneira de atender a essa demanda pode ser o uso de antimicrobianos naturais. Dentre estes compostos, destacam-se as bacteriocinas, que podem ser definidas como substâncias multifuncionais de natureza proteica, ribossomicamente sintetizadas por procariotos, que possuem atividade antimicrobiana em determinadas concentrações. Essas substâncias possuem diversos atrativos para o seu uso como bioconservantes, como: apresentam atividade inibitória frente a patógenos e deterioradores alimentares, são seguras para o consumo humano e são degradadas pelo trato gastrointestinal. Todavia, como ponto negativo, elas podem ser inativadas por outros determinados componentes dos alimentos. Nesse sentido, vem crescendo na literatura o número de publicações voltadas a entender como essas substâncias podem ser aplicadas nos alimentos e produtos alimentícios de uma forma efetiva e otimizada. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão na literatura sobre os antimicrobianos naturais, com foco nas bacteriocinas. A partir das informações encontradas, foi possível verificar que diversos antimicrobianos naturais vêm sendo estudados e/ou aplicados para a conservação dos alimentos. Isso pode ser um reflexo da busca pela substituição de conservantes como sais de benzoatos e sorbatos, comumente utilizados na indústria. Além disso, há uma preferência no uso das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL), onde existem várias formas de aplicação nos alimentos desses peptídeos ou proteínas com propriedades antimicrobianas. Entretanto, quando estas substâncias são produzidas diretamente no alimento pelos microrganismos, diversos fatores podem interferir nesta produção, assim como na eficiência dessas bacteriocinas nos alimentos. A indústria tem utilizado diferentes estratégias para reduzir os custos de produção e aumentar a sustentabilidade dos processos, como o uso de resíduos industriais, para a aplicação das bacteriocinas em alimentos com um preço competitivo.

Palavras-chave: Bacteriocinas, bioconservação de alimentos, antimicrobianos naturais.

ABSTRACT**Cecilia Caroline Pereira Vieira****Bacteriocins: a promising alternative for food bioconservation****Orientador: Marco Antônio Lemos Miguel****Coorientador: Felipe Miceli de Farias**

Abstract 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.

Currently, there is a growing interest among public food policies and consumers for foods without chemical preservatives or the ones that are considered minimally processed. However, the manufacture of food products with a reduced quantity or without any type of chemical preservative could reduce the life of the product and could result in a greater chance of proliferation of spoilage microorganisms and food pathogens. Thus, there is a need to use other methodologies for food preservation, methods that preferably do not alter the organoleptic characteristics of the product, with the objective, of maintaining its acceptability by the consumer and, consequently, avoiding economic losses. One way to meet this demand could be to use natural antimicrobials. Among these compounds, they stand out as bacteriocins, which can be defined as multifunctional substances of proteinaceous nature, ribosomally synthesized by prokaryotes which have antimicrobial activity at certain concentrations. There are several attractions for their use as biopreservatives, such as: they present inhibitory activity against pathogens and food spoilers, are safe for human consumption and are degraded in the gastrointestinal tract. However, as a negative point, they can be inactivated by other components of food. In this sense, the number of publications focusing on how these substances can be applied to foods and food products in an effective and optimized way has been growing in the literature. Thus, the present study aimed to conduct a review of the literature on natural antimicrobials with a focus on bacteriocins. Based in the found information, it was possible to verify that several pertinent natural antimicrobials have been studied and/ or researched for food preservation. This may be a reflection of the search for substitution of preservatives such as salts of benzoates and sorbates, commonly used in industry. In addition, there is a preference for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria (BAL), wherein there are several ways of applying these peptides or proteins with antimicrobial properties in foods. However, many factors can interfere in this production, when these substances are produced directly in the food by microorganisms, as well as in the efficiency of these bacteriocins in food. The industry has used different strategies to reduce production costs and increase the sustainability of the processes, such as the use of industrial residues, for the bacteriocins applications in foods at a competitive price.

Key-words: Bacteriocins, food biopreservation, natural antimicrobials

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dano celular induzido por ultrassom (US)	8
Figura 2. Efeitos direto e indireto da radiação.	9
Figura 3. Atributos (em escala) que medem a importância da naturalidade	15
Figura 4. Classificação dos taninos	20
Figura 5. Principais pesquisas no desenvolvimento do uso de bacteriocinas.....	30
Figura 6. Visualização de halos de inibição causados pela presença de bacteriocinas	34
Figura 7. Barreiras do trato gastrointestinal humano que são capazes de levar a perda da atividade de uma bacteriocina	35
Figura 8. Fatores que podem influenciar a produção de bacteriocina.....	40
Figura 9. Esquema de reaproveitamento de resíduo industrial para a produção <i>ex situ</i> de bacteriocinas..	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas.....	27
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATP – Adenosina Trifosfato
- BAL – Bactérias ácido lácticas
- CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*
- CEP – Campo elétrico pulsado
- CLIP – *Listeria Collection of the Pasteur Institute*
- DL – Decreto-lei
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DPC – *Dairy Products Research Center*
- DSMZ – *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*
- DTAs – Doenças transmitidas por alimentos
- EDTA – *Ethylene diamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino-tetra-acético)
- EFSA – *European Food Safety Authority*
- EUA- Estados Unidos da América
- FAO – *Food and Agriculture Organization*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- GRAS – *Generally recognized as safe* (geralmente reconhecido como seguro)
- HTST – *High temperature and short time*
- kDa – Quilodalton(s). 1.000 Da
- LD50 – *Lethal dose 50*
- LLS – Listeriolisina S
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTLT – *Low temperature and long time*
- Mb – Megabase
- MRS – *De Man, Rogosa e Sharpe*
- NBD – *Nucleotide-binding domains* (domínios ligantes de nucleotídeos)
- RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
- SAK – Culture medium for *Lactobacillus sakei* (meio de cultura para *L. sakei*)
- TMD – *Transmembrane domains* (domínios transmembrana)
- UHT – *Ultra High Temperature*
- WHO – *World Health Organization*

ÍNDICE

RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE QUADROS.....	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. DESENVOLVIMENTO.....	4
CAPÍTULO 1. CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	4
3.1.1 Relevância da conservação dos alimentos e produtos alimentícios	4
3.1.2 Métodos não convencionais de conservação dos alimentos.....	7
3.1.3 Métodos convencionais de conservação dos alimentos	10
3.1.4 Riscos associados ao uso de conservantes químicos.....	12
CAPÍTULO 2. CONSERVAÇÃO NATURAL DE ALIMENTOS E PRODUTOS ALIMENTÍCIOS	13
3.2.1 Crescente busca por conservantes naturais	13
3.2.2 Antimicrobianos naturais de origem animal	16
3.2.3 Antimicrobianos naturais com origem vegetal	19
3.2.4 Antimicrobianos naturais produzidos por algas e fungos	21
3.2.5 Antimicrobianos naturais produzidos por bactérias e vírus	22
CAPÍTULO 3. BACTERIOCINAS.....	24
3.3.1 Aspectos gerais.....	24
3.3.2 Classificação e mecanismos de ação das bacteriocinas	25
3.3.3 Usos biotecnológicos das bacteriocinas	29
CAPÍTULO 4. BACTERIOCINAS COMO BIOCONSERVANTES	30
3.4.1 Aplicação das bacteriocinas nos alimentos e produtos alimentícios.....	31
3.4.2 Atrativos no uso de bacteriocinas produzidas por BAL na bioconservação	33
3.4.3 Mecanismos de resistência às bacteriocinas e seu impacto na bioconservação	36
3.4.4 Produção de bacteriocinas para bioconservação de alimentos.....	38
3.4.4.1 Fatores que afetam a produção e eficiência das bacteriocinas nos alimentos ...	39
3.4.4.2 Meios alternativos para a produção de bacteriocinas por BAL.....	42
4. CONCLUSÕES.....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

Para a produção de um alimento seguro, é necessário que seja feita a prevenção da contaminação física, química e biológica do mesmo. Isso é feito com o propósito de se evitar riscos à saúde do consumidor. Para isso, deve-se atender tanto às legislações, quanto à implementação de metodologias de qualidade para a análise do processo de fabricação (da Silva Quintino e Rodolpho, 2018). Nesse contexto, os critérios microbiológicos podem ser considerados ferramentas que podem ser utilizadas, não somente para garantir a segurança dos alimentos, mas também a qualidade dos mesmos (Stavropoulou e Bezirtzoglou, 2019).

Segundo a resolução da diretoria colegiada (RDC) N° 331, de 23 de dezembro de 2019, “o padrão microbiológico é que define a aceitabilidade de um alimento ou de um lote de alimento, baseado na ausência, presença, ou número de microrganismos, ou na concentração das suas toxinas ou metabólitos, por unidade de massa, volume, área ou lote”. Esse padrão foi estabelecido justamente para orientar o que pode ser considerado um alimento seguro para consumo, e também para identificar se as práticas de higiene estão sendo adequadas (ANVISA, 2020).

A existência destes padrões microbiológicos aumenta a segurança na cadeia de produção de alimentos, uma vez que exige maiores esforços dos produtores em relação à elaboração e comercialização de alimentos inócuos. Uma forma de buscar que os alimentos atinjam os padrões é o emprego de métodos de conservação de alimentos, que podem ser divididos didaticamente em físicos, químicos e biológicos.

Alguns conservantes químicos presentes em alimentos já vêm sendo relacionados a malefícios para o corpo humano. Além disso, o aumento do consumo desse tipo de alimento ocasionou uma demanda da população por alimentos minimamente processados e conservantes considerados naturais (Cleveland *et al.*, 2001; Dwivedi, 2017). A não utilização de conservantes químicos para atender a essa demanda poderia acarretar uma redução do tempo de vida dos produtos alimentícios. Adicionalmente, haveria uma maior chance de proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos colocando em risco a saúde humana (Mills, Ross e Hill, 2017). Assim, uma solução para essa questão é a utilização de antimicrobianos naturais.

De forma geral, os antimicrobianos naturais podem ter diferentes origens e alguns já vêm sendo estudados ou usados para a conservação de alimentos, como as bacteriocinas. Segundo Hammami, Fliss e Corsetti (2019), as bacteriocinas podem ser usadas em um alimento de forma a garantir que o mesmo seja minimamente processado, com qualidade e segurança, sem a adição de conservantes químicos. Dessa forma, essas bacteriocinas podem atender a essa demanda por produtos mais naturais.

Existem vários atrativos que podem estar envolvidos na escolha do uso das bacteriocinas como bioconservantes de alimentos e a presença de fatores que podem ser um empecilho para esse uso. Dessa forma, faz-se necessário aumentar o conhecimento sobre a aplicabilidade das bacteriocinas nos alimentos e produtos alimentícios para sua utilização como bioconservantes, de modo a compreender as vantagens e desvantagens do uso desses compostos sobre outros antimicrobianos naturais e dos conservantes tradicionalmente utilizados.

2. OBJETIVO

Realizar uma revisão bibliográfica dos principais tópicos relacionados aos antimicrobianos naturais, com ênfase nas bacteriocinas.

2.1 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão na literatura sobre a importância da conservação de alimentos;
- Compreender como a tendência dos consumidores por alimentos mais naturais pode ser atendida pelo uso de antimicrobianos naturais, com ênfase no uso das bacteriocinas;
- Reunir informações na literatura sobre antimicrobianos naturais;
- Entender “o estado da arte” sobre as bacteriocinas, suas aplicações nos alimentos e sua possível produção usando resíduos industriais, com destaque no uso do soro de leite.

3. DESENVOLVIMENTO

Capítulo 1. Conservação de alimentos

3.1.1 Relevância da conservação dos alimentos e produtos alimentícios

No Brasil, os alimentos podem ser definidos segundo o DL N° 986, Art. 2°- I de 21 de outubro de 1969, como “toda substância ou mistura de substâncias, no estado sólido, líquido, pastoso ou qualquer outra forma adequada, destinadas a fornecer ao organismo humano os elementos normais à sua formação, manutenção e desenvolvimento”. Os produtos alimentícios, diferentemente, são definidos como todo alimento derivado de matéria-prima alimentar, de alimento *in natura*, ou ainda, de outras substâncias permitidas e que são obtidos por processo tecnológico adequado (Brasil, 1969).

Do ponto de vista químico, esses alimentos contêm água, gordura, carboidratos, proteínas e minerais. Esse teor permite o crescimento de microrganismos que são capazes de metabolizar parte desses componentes e obter energia (Sharif *et al.*, 2017). Tais microrganismos, uma vez nos alimentos, podem ser classificados de diferentes formas. Existem microrganismos adicionados propositalmente que são desejáveis nos alimentos e que possuem finalidades tecnológicas e nutricionais, podendo ser usados na fabricação de iogurte e queijo, por exemplo. Há também os deterioradores; produtores de metabólitos tóxicos; patogênicos ou ainda, aqueles com potencial de serem considerados patogênicos (ANVISA, 2018). Esses últimos quatro tipos podem ser considerados indesejáveis nos alimentos e produtos alimentícios, já que podem gerar perdas econômicas, doenças alimentares e até a morte.

Adicionalmente, existem os microrganismos que são considerados inócuos, ou seja, que não são benéficos ou indesejáveis, devido à ausência de estudos que indiquem seu papel nos alimentos e/ou de sua biologia. Há também os microrganismos não cultiváveis que podem ser detectados apenas por técnicas de diagnóstico molecular. A inclusão de um microrganismo em uma das categorias citadas pode ser estirpe variável, porque um componente de uma espécie pode se comportar de forma benéfica, inócua ou patogênica.

Uma preocupação das indústrias de alimentos é a contaminação de seus produtos por microrganismos patogênicos que possam causar doenças aos consumidores (Parada *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) é estimado que 600 milhões de pessoas no mundo adoeçam após ingerir alimentos contaminados e que 420.000 morram a cada ano devido a isso (WHO, 2020).

Dados de 2018 do Ministério da Saúde indicaram, no Brasil, 597 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), as quais podem ser causadas por ingestão de alimento contaminado por microrganismos patogênicos e de suas toxinas. Dentre estes surtos, 120 foram causadas por *Escherichia coli*. Foram totalizados 916 hospitalizações e 9 mortes, indicando a importância da segurança dos alimentos (Brasil, 2016a).

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2003), a segurança de alimentos está relacionada com os riscos que podem tornar um alimento prejudicial à saúde do consumidor. Pode-se definir essa segurança como o conceito que indica que o alimento consumido não vai causar qualquer tipo de dano. Atualmente, essa segurança tem sido desafiada por alguns fatores. O primeiro é relacionado às mudanças climáticas, pois alteram os padrões de temperatura e precipitação de chuvas podendo influenciar no aparecimento de doenças. Isso ocorre porque o aumento de chuvas pode elevar o escoamento superficial da água que ao entrar em contato com microrganismos presentes em esterco de gado, pode carrear-los para plantações direcionadas ao consumo humano. O segundo fator é o aumento do número de consumidores em risco (como idosos e imunocomprometidos) e a alteração nas tendências de consumo, como a busca por alimentos minimamente processados e frescos (Liu, Hofstra e Franz, 2013; King *et al.*, 2017).

A exigência da produção em larga escala de produtos alimentícios, causada pela globalização do comércio de alimentos e o aumento da população, é mais um desafio para a manutenção da segurança do alimento, pois acarreta na necessidade de se manter tal segurança e qualidade, desde a fabricação até a entrega aos consumidores, devendo ocorrer dentro dos prazos de validade estabelecidos para tais produtos (Johnson *et al.*, 2018)

O prazo de validade é o período de tempo, que pode ser desde dias até anos, em que o alimento permanece seguro para ser consumido. Isso significa que contém uma carga microbiana que não representa risco para o consumidor e que mantém suas características nutricionais e sensoriais típicas (ANVISA, 2018). A vida de prateleira de um alimento ou produto alimentício é o período em que o alimento permanece estável, ou seja, com suas características organolépticas desejáveis (Rawat, 2015).

Importante ressaltar que a longa distância que o produto deve percorrer do local de produção até o consumidor é um fator importante na necessidade do aumento desse tempo de prateleira/ vida (Rawat, 2015). Isso ocorre devido à extensa distância entre o local de produção do alimento até o consumidor que faz com que a deterioração de alimentos tenha que ser prevenida por um longo período de tempo (Hammond *et al.*, 2015) e somado a isso, há a possibilidade do transporte e a temperatura de armazenamento no mesmo serem inadequados.

O que ocorre não só em países com dimensões continentais como o Brasil, mas a nível global. A deterioração de um alimento pode ser considerada um processo metabólico, que leva à alterações nas suas características sensoriais, de tal maneira, que esse pode se tornar inaceitável para o consumo humano (Rawat, 2015). Pode ocorrer devido a fatores como a presença de microrganismos deterioradores no alimento.

A ação de microrganismos deterioradores resulta em alterações organolépticas do alimento que podem acarretar uma rejeição do mesmo pelo consumidor. Isso pode ocorrer ainda que a segurança do alimento permaneça intacta pela ausência de patógenos alimentares e de suas possíveis toxinas. O que pode gerar perdas econômicas, não somente pelo desperdício do alimento em si, mas também pelos impactos econômicos decorrentes dos recursos utilizados para a fabricação do produto, que podem estar relacionados ao consumo desnecessário de água, fertilizantes e energia (Rawat, 2015).

Dessa maneira, uma redução da deterioração dos alimentos leva a uma diminuição do custo de produção, comercialização e distribuição do alimento. As consequências disso são a queda do preço do produto final para o consumidor e o incremento da renda do produtor rural. Sabendo disso, é possível usar os métodos de conservação para evitar as perdas econômicas decorrentes da deterioração dos alimentos e garantir a qualidade e segurança dos mesmos (Rawat, 2015; Sharif *et al.*, 2017).

É possível definir a conservação dos alimentos como um conjunto variado de técnicas e procedimentos que podem ser aplicados em um alimento com intuito de preservar o tempo de vida do produto (Amit *et al.*, 2017). De maneira geral, a preservação eficiente de alimentos tem como benefícios: (i) garantir a segurança alimentar e em consequência disso, evitar doenças e mortes causadas por patógenos alimentares; (ii) reter a qualidade do alimento até o final do prazo de validade; (iii) prevenir sua deterioração e a perda econômica decorrente e (iv) evitar o desperdício de alimentos (Rawat, 2015; Johnson *et al.*, 2018; Szymkowiak *et al.*, 2020).

Para a prevenção da deterioração causada por microrganismos, evita-se a colonização do alimento por esses através da obstrução do acesso ao mesmo. Adicionalmente, evita-se a multiplicação dos microrganismos no alimento tornando as condições do meio desfavoráveis para a sua proliferação (Hammond *et al.*, 2015). Essas estratégias são empregadas com o uso de métodos de conservação de alimentos.

Atualmente existem diferentes classificações referentes às tecnologias de conservação de alimentos, por exemplo, a divisão dos métodos de conservação em: físicos, químicos, biológicos, tecnologias convencionais e não convencionais.

3.1.2 Métodos não convencionais de conservação dos alimentos

Atualmente, existem novas tecnologias de conservação dos alimentos que possuem potencial para serem usadas nos alimentos como: a filtração, campo elétrico pulsado, ultrassom, irradiação e uso de plasma frio. A filtração por membrana é um método físico de esterilização por separação. O uso de membranas com poros menores que os tamanhos de microrganismos resulta na separação do alimento líquido (como sucos) e dos microrganismos que estavam presentes nele. Esse método pode ser classificado em microfiltração, ultrafiltração e osmose reversa de acordo com o tamanho dos poros (Ibrahim, 2020).

A tecnologia de campo elétrico pulsado (CEP) usa pulsos de altas voltagens em um curto período de tempo (milissegundos ou submicrosegundos) no alimento, levando à formação de poros nas membranas dos microrganismos ou aumentando os que já existem. Com isso, há o extravasamento de conteúdo intracelular causando a morte dos microrganismos presentes no alimento (Jan *et al.*, 2017). Como a CEP não usa o calor, seu uso acarreta alterações mínimas nas características sensoriais e físicas dos alimentos. Apesar disso, há certa restrição em seu uso por ter efeito limitado sobre esporos e não deve ser usada em alimentos que tem condutibilidade alta ou variável. Além disso, a CEP não deve ser utilizada sobre alimentos que contenham ou formem bolhas, pois elas causam uma ruptura dielétrica prejudicando a eficiência dessa tecnologia (Jan *et al.*, 2017).

O ultrassom é um método físico de conservação dos alimentos em que ondas ultrassônicas percorrem o meio levando à formação de bolhas pelo processo de cavitação. Essas bolhas entram em colapso causando a criação de regiões de alta temperatura e pressão que, eventualmente, explodem e ocasionam diretamente a morte dos microrganismos presentes no local (Jan *et al.*, 2017; Altaf *et al.*, 2018). O processo de cavitação também causa danos na estrutura celular e à morte de microrganismos que não foram atingidos pela explosão (**Figura 1**). Fatores como temperatura, viscosidade e frequência do ultrassom podem alterar a intensidade do colapso dessas bolhas (Chemat e Khan, 2011; Altaf *et al.*, 2018).

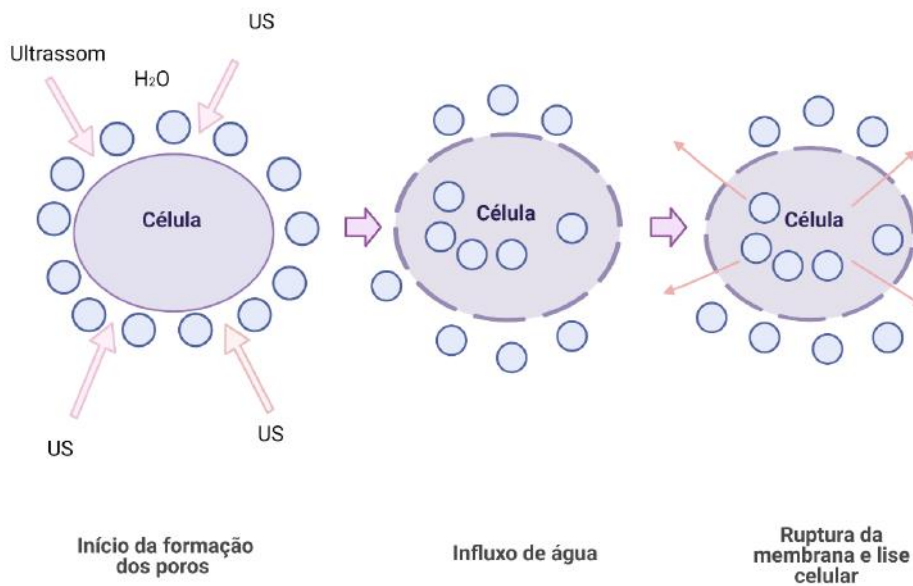


Figura 1. Dano celular induzido por ultrassom (US). A técnica de ultrassom permite que ondas ultrassônicas percorram o meio levando ao processo de cavitação, que por sua vez, pode danificar a estrutura celular. Isso ocasiona a formação de poros na membrana do microrganismo, a saída de componentes essenciais à vida celular e permite a ocorrência de morte celular por lise osmótica. Modificado de Chemat e Khan, 2011 e Altaf *et al.*, 2018. Recriado com BioRender.com

A tecnologia de ultrassom pode ser associada a outras metodologias para aumentar sua eficácia, como o uso de baixas temperaturas, que é conhecido como ultrassonicação. Além dessa, há a termossonicação que usa o ultrassom associado a altas temperaturas; manossoonicação que combina o uso de ultrassom com a pressão e a manotermossoonicação, que combina o uso de calor, ultrassom e pressão (Ercan e Soysal *et al.*, 2013; Altaf *et al.*, 2018).

Outro método não convencional de conservação é a irradiação. Segundo Ibrahim (2020), a irradiação como método de conservação de alimentos, frequentemente, não possui uma boa aceitação. Por isso, é necessário educar os consumidores de que essa tecnologia não torna os produtos alimentícios radioativos.

A irradiação causa danos aos microrganismos que podem ser divididos em diretos e indiretos (**Figura 2**). O dano direto ocorre quando a radiação atinge diretamente o ácido desoxirribonucleico (DNA), causando uma mudança em sua estrutura que ocasiona a morte celular. Já o dano indireto ocorre quando a radiação resulta na produção de radicais livres por atingir moléculas de água presentes na estrutura celular. Esses radicais livres, como o hidroxil, podem reagir com o DNA causando danos em sua estrutura que levam à morte celular (Desouky, Ding e Zhou *et al.*, 2015).

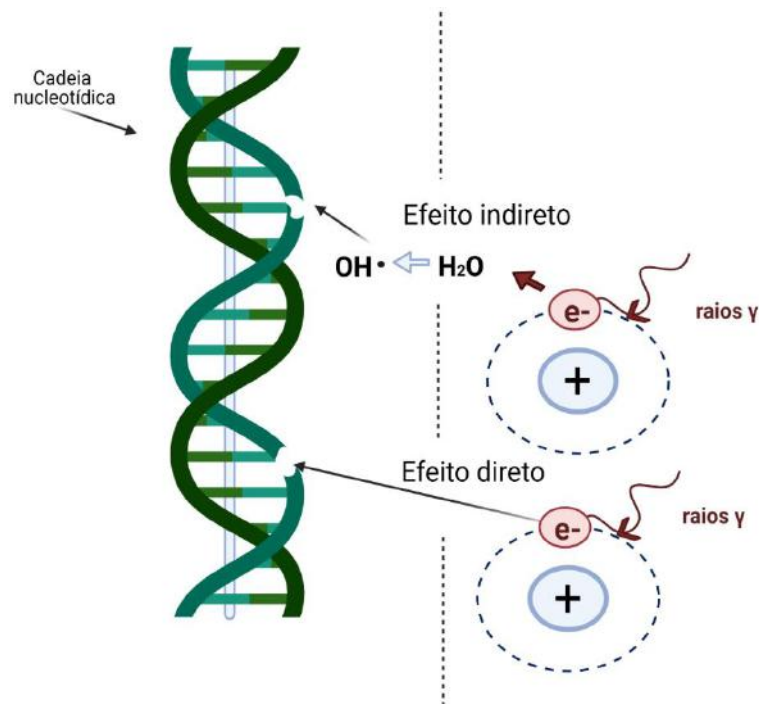


Figura 2. Efeitos direto e indireto da radiação. A radiação ao atingir diretamente o DNA do microrganismo causa uma alteração em sua estrutura e, conseqüentemente, resulta na morte celular. Ao atingir moléculas de água, provoca a formação de radicais livres que, por sua vez, atingem a estrutura do DNA levando à morte celular. Modificado de Desouky, Ding e Zhou, 2015. Recriado com BioRender.com

A irradiação como método de conservação dos alimentos para a eliminação dos microrganismos possui sua eficácia atrelada a vários fatores como as espécies, o número de microrganismos presentes nos alimentos e a presença ou não de esporos (Ajibola, 2020).

Outra tecnologia não convencional é o uso de plasma frio, que é obtido em temperaturas próximas à temperatura ambiente e gerado a partir da aplicação de eletricidade ou campo magnético sobre um gás, formando o plasma (estado ionizado de um gás). Isso acontece porque quando a eletricidade é aplicada, os elétrons que compõem o gás são excitados e, quando retornam ao seu estado natural, emitem energia em forma de luz UV e radiação (López *et al.*, 2019).

O plasma é constituído de radicais livres e espécies reativas de oxigênio que estão relacionadas a ação antimicrobiana, sendo a presença desses radicais uma possível explicação para a ação antimicrobiana do plasma. Apesar disso, o mecanismo pelo qual o plasma atua sobre os microrganismos ainda não foi totalmente elucidado (López *et al.*, 2019). A tecnologia de plasma frio possui potencial para ser utilizada na indústria de alimentos para a desinfecção de vários alimentos como o peixe, aves e leite em pó. Além disso, os íons do plasma frio podem atingir superfícies onduladas e rachadas de forma mais eficaz que o método de aplicação de luz ultravioleta (UV), por exemplo (Misra *et al.*, 2011). Apesar da existência desse e de outros

métodos de conservação considerados modernos ou não convencionais, os métodos tradicionais, como a fermentação, continuam sendo uma opção para a conservação dos alimentos.

3.1.3 Métodos convencionais de conservação dos alimentos

Existem métodos de conservação de alimentos utilizados há décadas que são considerados convencionais como a fermentação, pasteurização, refrigeração, enlatamento, congelamento, entre outros.

A fermentação como método de conservação de alimentos é utilizada há séculos pela humanidade, ainda que por muito tempo sua relação com microrganismos fosse desconhecida. Pode ser considerado um método barato de conservação dos alimentos, pois necessita de equipamentos pouco sofisticados para sua realização. Por isso, pode ser utilizado em substituição a outros métodos como a refrigeração e ser utilizado por produtores rurais de baixa renda (Ross, Morgan e Hill, 2002; Hasan, Sultan e Mar-E-Um, 2014).

A fermentação pode ser definida como um processo metabólico de produção de adenosina trifosfato (ATP) em que o açúcar é consumido sobre condições anaeróbias (Mani, 2018). Existem diversos tipos de processos fermentativos como: fermentação láctica, alcoólica e acética (Melo Barros *et al.*, 2020). Na fermentação etílica (alcoólica) os produtos finais são o etanol e o gás carbônico, enquanto que na acética, é o ácido acético. A formação desse ácido ocorre através da oxidação do etanol feita por bactérias ácido acéticas, o que está relacionado à produção do vinagre (Mani, 2018).

A fermentação láctica é feita, principalmente, por bactérias ácido lácticas (BAL) cujo produto final majoritário é o ácido láctico. O fato de as BAL serem os microrganismos mais encontrados nos alimentos fermentados faz com que sejam os maiores contribuidores para certos benefícios associados a esses tipos de alimentos. Isso porque contribuem para a preservação dos alimentos, ou seja, para a segurança dos alimentos. Essa conservação se dá pela inibição de microrganismos pela redução causada no pH do meio; pela competição por nutrientes entre as BAL e outras bactérias presentes no alimento e pela produção de compostos inibitórios como o peróxido de hidrogênio (Cooke, Twiddy e Reilly, 1987; Hasan, Sultan e Mar-E-Um, 2014).

A pasteurização é um exemplo de método físico de conservação de alimentos, comumente utilizada por ser capaz de matar microrganismos patogênicos e deterioradores que não são resistentes ao calor e pode ser aplicada em alimentos como leite. Possui como objetivo

inativar as enzimas e matar células vegetativas de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos. Pode ser subdividida em diferentes tipos como: (a) lenta ou *low temperature and long time* (LTLT), em que geralmente são empregadas temperaturas em torno de 63 °C por 30 minutos; (b) rápida pasteurização ou *high temperature and short time* (HTST), em que são empregadas temperaturas na faixa de 72 °C por 15 minutos e (c) ultrapasteurização, que emprega temperaturas altas por um curto período (138 °C por 2 segundos). Após o processo de pasteurização ocorrer, o alimento é armazenado em baixas temperaturas para evitar a germinação de esporos e a proliferação de algumas bactérias que possam ter sobrevivido ao processo (Ibrahim, 2020).

Outro método físico que usa a temperatura para preservar os alimentos é a refrigeração, mas ao contrário da pasteurização, ela usa baixas temperaturas. A temperatura de refrigeração a ser empregada depende não somente do tipo de alimento, mas também dos microrganismos que usualmente se multiplicam em cada um deles. O congelamento, que é um outro exemplo de conservação pelo uso de baixas temperaturas, atua de forma a não só reduzir a temperatura ideal de crescimento de muitos microrganismos, mas também a diminuir a atividade de água pela sua imobilização na forma de gelo (Leonardi e Azevedo, 2018).

A adição de aditivos químicos nos alimentos como os conservadores, que são usualmente conhecidos no mercado como conservantes, é um exemplo de método químico de conservação dos alimentos. Segundo a Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, os aditivos são ingredientes que são adicionados de forma intencional e sem um propósito de nutrir durante algum momento do processo de fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou ainda, manipulação de um alimento. Isso ocorre para ocasionar alterações nas características físicas, químicas, biológicas e sensoriais do mesmo (Brasil, 1997b).

Tais aditivos alimentares podem ser classificados com base em suas funções como: (i) conservador, que é definido como uma substância com a capacidade de impedir ou retardar a alteração dos alimentos, causada tanto por microrganismos quanto por enzimas; (ii) antiespumante; (iii) antiúmectante; (iv) corante; (v) agente de massa; edulcorante; (vi) espessantes; (vii) gelificante; (viii) estabilizante; (ix) aromatizante; (x) umectante; (xi) regulador de acidez; (xii) acidulante; (xiii) emulsionante/emulsificante; (xiv) melhorador de farinha; (xv) realçador de sabor; (xvi) fermento químico; (xvii) glaceante; (xviii) agente de firmeza; (xix) estabilizante de cor e (xx) espumante (Brasil, 1997b).

Os conservantes podem ser divididos quimicamente em: (a) antimicrobianos (b) antioxidantes e (c) antienzimáticos. Quanto à sua origem, podem ser classificados em:

conservantes naturais e artificiais. Alguns exemplos de antimicrobianos naturais que podem ser usados como conservantes naturais incluem: lisozima, lactoferrina, quitosana, vitamina E, bacteriocinas, entre outros (Dwivedi, 2017; Hammami, Fliss e Corsetti, 2019). Dentre os conservantes artificiais como antimicrobianos, podem ser citados o benzoato de sódio, ácido benzóico, sorbato de sódio, sorbato de potássio, nitrito de sódio, propionato de cálcio e nitrato de sódio (Abdulmumeen, Risika e Sururah, 2012; Sharma, 2015).

Os aditivos, para serem utilizados em alimentos, precisam ser considerados seguros. Por isso é necessária uma avaliação toxicológica que indique o limite máximo permitido para o consumo (Brasil, 1997b). Alguns conservantes químicos têm sido relacionados a malefícios ao corpo humano, quando usados em grandes quantidades.

3.1.4 Riscos associados ao uso de conservantes químicos

O uso de certos conservantes antimicrobianos como o nitrito e nitrato são exemplos de conservantes associados a malefícios à saúde humana. Uma vez no corpo humano, o nitrato pode interagir com a hemoglobina, levando ao surgimento da metahemoglobina. Sua aparição tem como consequência o fornecimento inadequado de oxigênio aos tecidos. Isso pode ocasionar sintomas como urticária, coceira e perda de consciência. Essa falta de oxigenação adequada pode até levar à morte, especialmente na infância (Abdulmumeen, Risika e Sururah, 2012; Kumari *et al.*, 2019).

Uma vez no corpo, o nitrato pode ser convertido em nitrito por determinadas bactérias presentes na cavidade oral, quando chega ao estômago, o nitrito pode ser protonado e formar o ácido nitroso, que por sua vez, pode se decompor e dar origem ao óxido nítrico e trióxido de dinitrogênio (N_2O_3). Ainda no estômago, reações químicas envolvendo o ácido nitroso e N_2O_3 com aminas secundárias podem formar compostos como N-nitrosaminas (consideradas cancerígenas). O nitrito pode oxidar a hemoglobina em metahemoglobina comprometendo o transporte de oxigênio, culminando nos sintomas anteriormente citados (Weitzberg e Lundberg, 2013; EFSA, 2017b). Importante ressaltar que o nitrato pode ser ingerido pelo consumo de vegetais. Apesar disso, o consumo deste composto através da dieta não está relacionado a malefícios. Isso se deve, provavelmente, pelo fato de os vegetais possuírem altas quantidades de oxidantes, como vitaminas E e C. O que impede a ocorrência de reações químicas de formação de N-nitrosaminas (Weitzberg e Lundberg, 2013).

Cvetković e colaboradores (2019) avaliaram casos possíveis de envenenamento por nitrito de sódio em indivíduos adultos através da ingestão de salsichas contendo esse aditivo. Foi constatada a morte de um indivíduo por agravamento da hipertensão e doença cardíaca como resultado acidental de envenenamento por nitrito de sódio, que estava 30 vezes em maior dose permitida por lei nos Estados Unidos da América (EUA). O envenenamento por esse aditivo leva a sintomas dose-dependentes, ou seja: quanto maior a concentração do conservante, mais sintomas surgirão e de maneira mais severa.

Outro exemplo de aditivo que pode apresentar riscos é o benzoato de sódio, que pode desencadear reações indesejáveis aos seres humanos por estar relacionado com alergias e aparecimento de erupções cutâneas (Abdulmumeen, Risika e Sururah, 2012; Dwivedi, 2017). Uma vez sendo suspeito o uso de qualquer aditivo como causa de uma alergia, ocorre a necessidade de uma dieta eliminatória a fim de identificar qual alimento que contém certo aditivo causador da alergia. Isso pode ser difícil e demorado e por isso, pode influenciar na preferência do consumo de alimentos sem aditivos por ser uma prática mais segura de se evitar novas reações alérgicas (Abdulmumeen, Risika e Sururah, 2012; Bharti *et al.*, 2015). O consumo de alimentos ausentes de aditivos é uma tendência de consumo contemporânea, em que muitos buscam esse tipo de alimentos, mesmo sem o intuito de se evitar alergias.

Capítulo 2. Conservação natural de alimentos e produtos alimentícios

3.2.1 Crescente busca por conservantes naturais

Existe uma tendência da população pelo consumo de alimentos mais naturais ou minimamente processados. Essa tendência leva ao uso de aditivos naturais em detrimento dos artificiais, ou seja, sem ou com o teor reduzido de conservantes químicos (Carocho *et al* 2014; Rawat, 2015; Román, Sánchez-Siles e Siegrist, 2017). Tal inclinação pode ter consequências para a indústria de alimentos, pois os produtos que não forem percebidos como naturais para esses consumidores, não serão comprados, o que acarretará em perdas econômicas (Román, Sánchez-Siles e Siegrist, 2017).

Um dos vários questionamentos importantes que surgem em relação a essa tendência, é qual a exata definição de naturalidade de um alimento pelos consumidores e os critérios utilizados para mensurá-la. Segundo Roman, Sánchez-Siles e Siegrist (2017) a resposta a essa questão envolve dois principais pontos: (i) há diversos conceitos de alimentos naturais utilizados em literatura, não existindo assim uma única definição e (ii) existem, basicamente,

três categorias ou critérios que podem ser usados para definir um alimento como natural. Tais critérios são: i) a origem do alimento que está relacionada a agricultura orgânica e produção local; ii) a maneira com que esse alimento é processado e produzido que abrange os ingredientes naturais utilizados e a ausência de certos aditivos como conservantes, sabores e corantes artificiais, assim como hormônios, organismos geneticamente modificados, pesticidas e produtos químicos e, iii) o produto final e suas propriedades como sabor e frescor (**Figura 3**). É evidenciado, assim, como os critérios para considerar um alimento como natural para os consumidores podem estar relacionados desde a origem até o produto final.

Szymkowiak e colaboradores (2020) indicaram que os consumidores possuem a metodologia de processamento como fator mais importante na escolha de um produto, seguido das informações sobre os conservantes utilizados e os valores nutricionais contidos e o tempo de vida. Em contrapartida, Carochó e colaboradores (2014) indicaram que alguns consumidores já preferem alimentos minimamente processados e quando optam pelos processados, elege os que possuem menor quantidade de aditivos e/ou que contém aditivos naturais. Apesar de alguns consumidores preferirem alimentos sem nenhum conservante, pode-se utilizar os conservantes naturais em detrimento dos artificiais. Isso pode fazer com que a busca por alimentos mais naturais seja atendida, sem ocasionar: (i) a redução do tempo de vida do produto, pela ausência do conservante ou (ii) a necessidade de implementação de outros métodos de conservação de alimentos para substituir a falta do conservante e buscar manter a segurança do alimento.

A busca por alimentos sem conservantes também pode estar relacionada a uma preocupação dos consumidores em relação ao uso de animais para aprovação toxicológica. Esse é um dos fatores que causam uma desconfiança do uso de aditivos e pressionam as indústrias de alimento a utilizar aditivos naturais ao invés dos químicos, apesar de ser necessário o uso de mesma avaliação toxicológica tanto para conservantes químicos quanto naturais (Carochó *et al.*, 2014). Visando atender essa demanda por alimentos mais naturais, pode-se utilizar conservantes antimicrobianos naturais em detrimento dos sintéticos.

Os antimicrobianos naturais podem ter origens distintas e ser classificados mediante a essas diferentes procedências em: (i) antimicrobianos de origem animal; (ii) antimicrobianos de origem vegetal; (iii) antimicrobianos com origem em algas e cogumelos e (iv) antimicrobianos de origem viral ou bacteriana (Gyawali e Ibrahim, 2014; Quinto *et al.*, 2019).

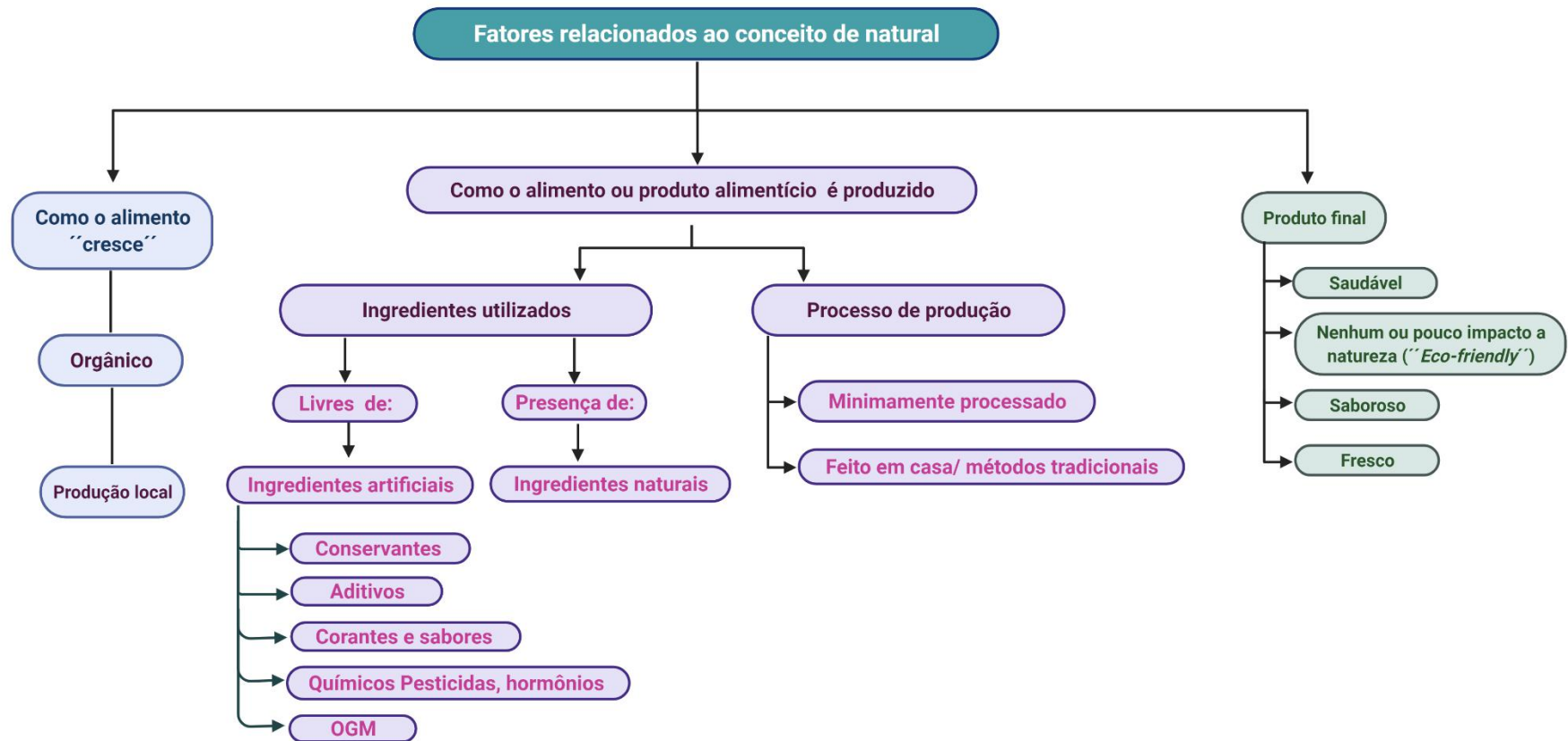


Figura 3. Atributos (em escala) que medem a importância da naturalidade pelos consumidores e podem ser usados para identificação do que é um alimento natural por um indivíduo. Organismos geneticamente modificados (OGM). Alterado de Roman, Sánchez-Siles e Siegrist (2017). Recriado com BioRender.com.

3.2.2 Antimicrobianos naturais de origem animal

Existem vários antimicrobianos de origem animal encontrados na natureza como as caseínas, lactoalbumina e lactoglobulinas (que são peptídeos derivados do leite), pleurocidina, ovotransferrina e protamina. Outros exemplos incluem as lactoperoxidases, lisozimas, quitosana e lactoferrina (Gyawali e Ibrahim, 2014).

A lactoperoxidase é uma enzima naturalmente encontrada no leite (humano ou não) e que faz parte do sistema lactoperoxidase. Esse sistema é composto por essa enzima, íon tiocianato (que também é um componente do leite) e peróxido de hidrogênio que, embora não esteja naturalmente no leite, pode ser adicionado ou é produzido pela ação de certos microrganismos que estão presentes no leite (Seifu, Buys e Donkin, 2005; WHO, 2006). Sua função está relacionada à atuação contra microrganismos (bactérias, vírus e parasitas) que possam vir a invadir o organismo (Kussendrager e Van Hooijdonk, 2000). Esses dois componentes do sistema lactoperoxidase reagem um com o outro, resultando na oxidação do íon tiocianato por peróxido de hidrogênio. Essa reação é catalisada pela enzima lactoperoxidase ocasionando a formação de compostos intermediários que possuem atividade antimicrobiana. O ácido hipotiocianico e o íon hipotiocianato são exemplos de compostos gerados a partir dessa reação e que possuem atividade antimicrobiana (Seifu, Buys e Donkin, 2005; Silva *et al.*, 2020b).

A atividade antimicrobiana da lactoperoxidase pode ser explorada para preservar a qualidade do leite *in natura*, de maneira a ser usada quando não há um sistema adequado de refrigeração durante seu transporte. Adicionalmente, pode-se utilizar temperaturas para conservação do leite, assim como outros métodos de conservação, mas não é utilizada como a única forma para garantir a segurança dos alimentos (Kussendrager e Van Hooijdonk, 2000; Seifu, Buys e Donkin, 2005; WHO, 2006; Silva *et al.*, 2020b).

Esse sistema possui pela *Food and Drug Administration* (FDA) o status *generally recognized as safe* (GRAS), ou seja, é considerado seguro utilizá-lo como aditivo. No entanto, no Brasil, esse sistema é considerado não como um aditivo alimentar, mas sim como um coadjuvante de tecnologia. Em outras palavras, é uma substância que não é considerada legalmente como um ingrediente alimentar, mas que pode ser adicionada propositalmente no alimento ou nos seus ingredientes. Isso pode ocorrer durante sua elaboração, mas deve ser necessariamente eliminada ou inativada no produto final. É possível usar o sistema lactoperoxidase na produção de alimentos semipreparados e de molhos aquosos (que possuam

uma faixa de pH entre 5.0 e 8.0) tratados termicamente por métodos adequados (Brasil, 1997a; Brasil, 1997b).

Outro antimicrobiano natural proveniente de animais é a lactoferrina, uma glicoproteína pertencente à família transferrina (Marchewka *et al.*, 2012), e que pode ser encontrada no leite, secreção vaginal, seminal, nasal, bile e lágrimas. Sua atuação antimicrobiana pode ser: (i) bacteriostática, que ocorre com a absorção do ferro do meio privando-o das bactérias, e (ii) ação bactericida, com a atuação direta dessa glicoproteína sobre o microrganismo, que pode ser uma bactéria, vírus ou ainda, parasitas. Como exemplo, a lactoferrina pode interagir tanto com lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas (causando a liberação do mesmo), quanto porinas, permitindo que a membrana plasmática fique instável (Masson, Heremans e Dive, 1966; Arnold e Cole, 1977; Farnaud e Evans, 2003; González-Chávez, Arévalo-Gallegos e Rascón-Cruz, 2009; Duran e Kahve, 2017).

Atualmente, a lactoferrina bovina possui o *status* GRAS pela FDA e pode ser aplicada para suplementação de alimentos no Japão (como iogurte, leite e bebidas), como também em produtos para pele e boca cujos efeitos esperados sejam de melhoramento da microbiota intestinal, imunomodulação e ação antioxidante (Wakabayashi, Yamauchi e Takase, 2006; FDA, 2013).

No regulamento de execução (EU) 2017/2470 da comissão de 20 de dezembro de 2017, é possível encontrar os valores máximos de lactoferrina bovina que podem ser utilizados em diferentes tipos de alimentos, como bolos, bebidas lácteas, bebidas à base de leite fermentado, entre outros. No Brasil, segundo o Relatório de Análise das Contribuições da CP nº 457/2017 da ANVISA, essa glicoproteína não está aprovada para sua inclusão em alimentos como fonte de proteínas.

A quitosana, que também é um exemplo de antimicrobiano de origem animal, pode ser definida como um copolímero atóxico que é composto por unidades N-acetilglicosamina e glicosamina. Embora seja naturalmente encontrado em fungos e algas verdes, é geralmente produzida industrialmente através do tratamento da quitina, sendo essa encontrada em exoesqueletos de artrópodes. Esse tratamento da quitina possui um baixo custo, e por isso, pode ser utilizado para produção em larga escala da quitosana. Seu mecanismo de ação sobre os microrganismos está relacionado com interações eletrostáticas na parede celular, membrana plasmática e citoplasma; ao desencadeamento de alterações do envelope celular e ao rompimento da integridade da membrana plasmática, levando bactérias à morte celular. (Campana Filho, Signini e Cardoso, 2007; Duan *et al.*, 2019; Hu e Gänzle, 2019; Tian e Liu, 2020).

A quitosana é solúvel em meios aquosos com pH ligeiramente ácido porque possui grupos aminos protonados e é insolúvel em meios neutros e alcalinos. Esse fato pode limitar a sua aplicação, porque é em meio com pH neutro que a maioria das enzimas exibem máxima atividade. Uma solução é obter derivados solúveis da quitosana para suas aplicações em meios com amplas faixas de pH (Campana Filho, Signini e Cardoso, 2007).

A quitosana pode ser utilizada na indústria farmacêutica, de alimentos, na área da biotecnologia e na agricultura. Em relação à indústria de alimentos, existe a possibilidade da quitosana ser usada para a preservação dos alimentos das seguintes formas: (i) diretamente nos alimentos e (ii) usando nanopartículas em embalagens. Sua contribuição para a área de alimentos pode relacionada não só à conservação dos alimentos, mas também a outros benefícios, como a retenção de coloração e nutrientes e a manutenção dos atributos sensoriais, por exemplo (Campana Filho, Signini e Cardoso, 2007; Hu e Gänzle, 2019).

A lisozima é um outro antimicrobiano natural de origem animal e pode ser definida como uma enzima capaz de catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas β -(1,4) entre os resíduos alternados de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina de peptidoglicana, um constituinte da parede celular das bactérias (Callewaert e Michiels, 2010). Por isso, uma vez interagindo com a parede celular bacteriana, a lisozima ocasiona a hidrólise da peptidoglicana, causando a lise celular pela perda da integridade dessa parede (Masschalck e Michiels, 2003).

Devido ao fato das bactérias Gram-negativas possuírem uma membrana externa, elas são menos sensíveis a atividade antimicrobiana dessa enzima, porque essa age como uma barreira impedindo a ação enzimática sobre a peptidoglicana. No entanto, essa questão pode ser contornada quando juntamente com a lisozima são adicionadas substâncias como o ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA). Essa diferença da constituição da bactéria (se é Gram-positiva ou negativa) está relacionada à sensibilidade ou resistência bacteriana a atuação dessa enzima. No entanto, não há só esse fator, pois já foi descrito um inibidor de lisozima em *E. coli* (Masschalck e Michiels, 2003).

Alguns estudos indicaram uma permanência da ação antimicrobiana da lisozima, ainda que a ação enzimática dessa tenha sido perdida por desnaturação. Isso aponta para a existência de uma outra ação antimicrobiana além da hidrólise da peptidoglicana, fato este ainda não totalmente elucidado. A lisozima possui o status GRAS pela FDA como conservador e possui vantagens como ser estável em diferentes faixas de pH e ter um baixo custo de obtenção por estar em grande quantidade em ovos. No Brasil, segundo a RDC N° 123, de 04 de novembro de 2016, a lisozima pode ser utilizada como um conservador de vinhos (Masschalck e Michiels, 2003; Brasil, 2016b).

3.2.3 Antimicrobianos naturais com origem vegetal

Há inúmeros compostos presentes nas plantas e em seus derivados que possuem atividade antimicrobiana (Gyawali e Ibrahim, 2014; Pisoschi, *et al.*, 2018). Os metabólitos secundários, que podem ser encontrados em plantas, podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em: (i) polifenóis e fenólicos que incluem os flavonóides; quinonas; taninos; cumarinas; alcalóides; terpenóides, e também (ii) lectinas e polipeptídeos, cada um desses componentes podem atuar nos microrganismos causando a morte celular a partir de diferentes mecanismos de ação (Upadhyay *et al.*, 2014). Um dos antimicrobianos naturais mais encontrados em plantas são os taninos, os quais estão presentes em quase todas as partes dos vegetais (como sementes, folhas, raízes e madeira) como mostrado por Pizzi, (2019).

Os taninos podem ser categorizados em: (i) taninos hidrolisáveis, (ii) condensados, (iii) complexos e (iv) florotaninos (presentes apenas nas algas) como está indicado na **Figura 4**. Estão presentes geralmente em frutas e vegetais e, com isso, estão naturalmente presentes na dieta humana. São consumidos, por exemplo, na ingestão de vinho e contribuem para o amargor e adstringência dessa bebida. No entanto, apesar dos taninos estarem presentes na dieta, pouca quantidade é consumida. Isso porque as partes que os contêm nos vegetais, usualmente, não são comestíveis, por exemplo, a casca de uma noz (Molino *et al.*, 2019).

Segundo Farha e colaboradores (2020) é possível identificar que os taninos podem atuar de diferentes formas sobre os microrganismos, podendo: (i) agir como um quelante de ferro, privando-o das bactérias do meio; (ii) interferir na capacidade de síntese da parede celular, tornando a bactéria sensível a uma lise osmótica, (iii) inibir *quorum sensing* das bactérias do meio e (iv) interferir na capacidade de formação de biofilme. No Brasil, segundo a RDC N° 123, de 04 de novembro de 2016, os taninos podem ser utilizados como coadjuvantes de tecnologia para a fabricação de bebidas alcoólicas, por exemplo (Brasil, 2016b).

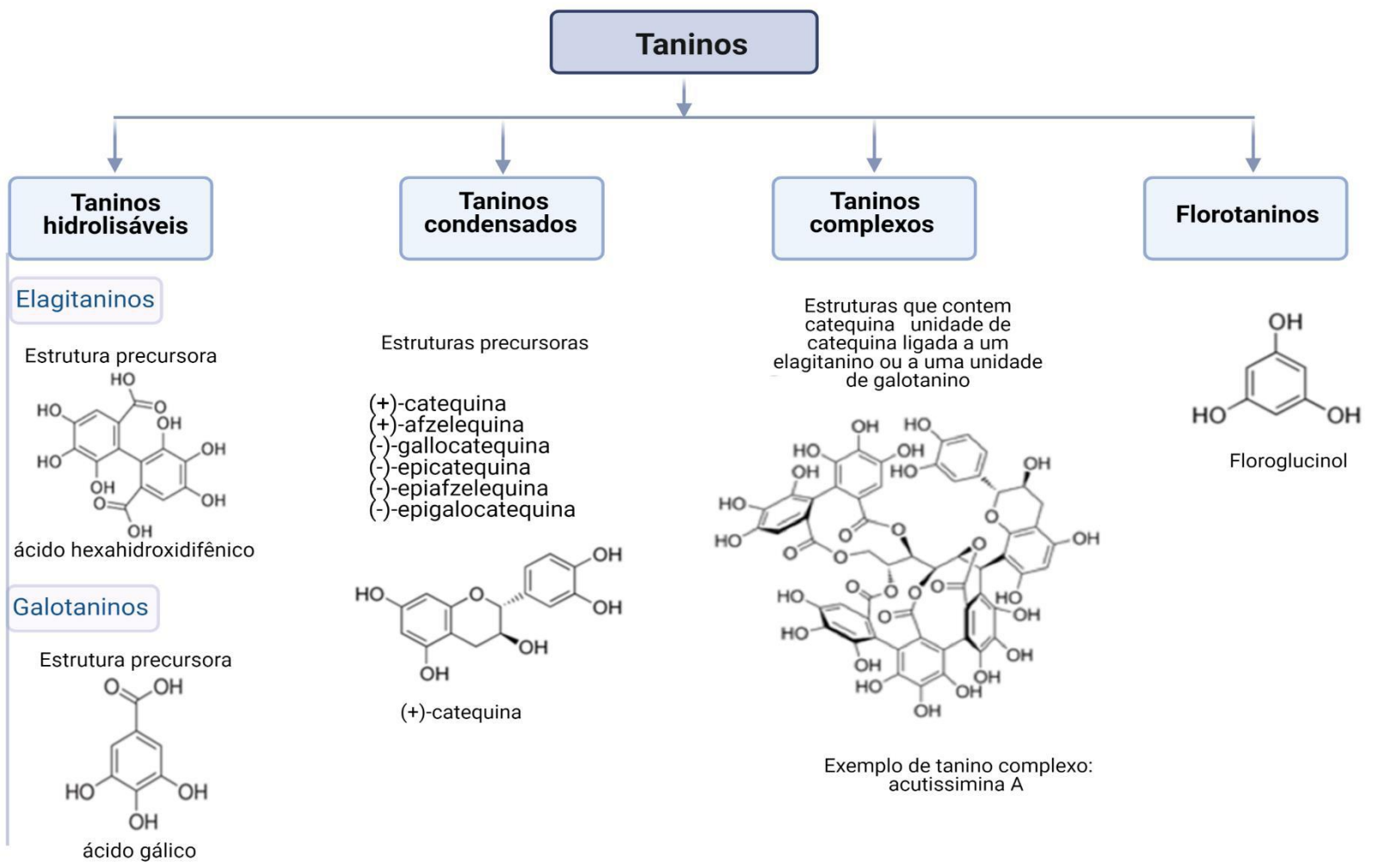


Figura 4. Classificação dos taninos. Adaptado de Molino *et al.*, 2019. Recriado com BioRender.com

3.2.4 Antimicrobianos naturais produzidos por algas e fungos

Assim como ocorre nos fungos, ainda há pouco conhecimento em relação aos antimicrobianos provenientes de algas e sua aplicação em alimentos como conservantes. Já existem avaliações no uso de extratos de algas para a conservação de alimentos, quer sejam como ingredientes ou filmes biodegradáveis, ou embalagens ativas com funções de antibiofilme (Silva *et al.*, 2020a). São exemplos de antimicrobianos naturais os florotananos e os compostos fenólicos, mencionados a seguir por serem exclusivos de algas e estarem relacionados a propriedades antimicrobianas presentes em cogumelos, respectivamente.

Os florotananos (**Figura 4**) são metabólitos secundários encontrados exclusivamente em algas. Existem vários tipos de florotananos e, nas algas, possuem como papéis conhecidos o (i) auxílio na proteção contra a herbivoria e (ii) proteção contra o estresse ambiental. As algas marinhas são consideradas uma fonte de alimento rico e saudável, e com isso, é possível utilizar seus florotananos como ingredientes, tanto para a indústria farmacêutica quanto para a de alimentos (Li *et al.*, 2011; Eom, Kim e Kim, 2012; Molino *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020a).

Florotananos podem apresentar atividade inibitória frente a patógenos alimentares contribuindo para a segurança de alimentos. Além disso, podem inibir o crescimento de bactérias resistentes a antimicrobianos e fungos, sendo seu mecanismo de ação associado à: (i) inibição da fosforilação oxidativa, (ii) capacidade de sua ligação a certas proteínas bacterianas promovendo a morte celular e (iii) habilidade de ocasionar uma alteração na permeabilidade celular (Eom, Kim e Kim, 2012; Shannon e Abu-Ghannam, 2016).

Os cogumelos selvagens, que não são geralmente cultivados para o consumo humano, vêm sendo utilizados como biorecursos para a descoberta de novos antimicrobianos naturais. Devido a sua grande biodiversidade, podem ser uma excelente fonte de compostos bioativos e possuem potencial de aplicação como conservantes naturais (Gyawali e Ibrahim, 2014; Shen *et al.*, 2017).

Os compostos antibacterianos dos cogumelos podem ser metabólitos intracelulares ou extracelulares, e também podem ser obtidos através de extratos tanto do corpo de frutificação quanto do filtrado da cultura micelial. Esses extratos, mesmo que provenientes de um mesmo cogumelo, podem ter no final diferentes propriedades antibacterianas dependendo da parte em que o extrato foi feito. Muitas dessas propriedades antibacterianas presentes nos cogumelos podem ser provenientes de compostos fenólicos, que não são exclusivos dos cogumelos, sendo encontrados em diferentes plantas. Tais compostos podem ser definidos como compostos

orgânicos com um ou mais grupos hidroxil presente em um ou mais anéis aromáticos. Os compostos fenólicos possuem atividade antimicrobiana e antioxidante e, por isso, podem ser utilizados como conservantes (Lule e Xia, 2005; Shen *et al.*, 2017).

Existem poucos estudos em relação à aplicação da atividade antimicrobiana de cogumelos na preservação de alimentos. Sabe-se que para a conservação de alimentos, os cogumelos podem ser diretamente adicionados nos alimentos, uma vez que muitos são comestíveis e que seu uso como antimicrobiano já foi associado à modulação da microbiota e ao prolongamento do tempo de vida de um alimento. Como obstáculo ao uso destes microrganismos na conservação de alimentos, observa-se que a quantidade de componentes antimicrobianos presentes nos cogumelos, como os compostos fenólicos, é relativamente baixa. Para seu uso como conservantes, é necessário obter uma grande quantidade de cogumelos (Shen *et al.*, 2017).

3.2.5 Antimicrobianos naturais produzidos por bactérias e vírus

Atualmente, existem alguns antimicrobianos naturais provenientes de bactérias e vírus que podem ser usados como conservantes naturais de alimentos como os bacteriófagos e as bacteriocinas, respectivamente. Existem outras substâncias com potencial para tal uso, como a reuterina, cujos mecanismos de ação são expostos a seguir.

A reuterina é uma molécula antimicrobiana de amplo espectro de ação, que pode atuar contra patógenos alimentares e microrganismos deterioradores, produzida por estirpes de *Lactobacillus reuteri*. A reuterina possui uma resistência à atuação de proteases, evidenciando sua natureza não proteica, diferentemente das bacteriocinas que serão descritas nos próximos capítulos (Axelsson *et al.*, 1989; Gyawali e Ibrahim, 2014).

Existem duas hipóteses para o mecanismo de atuação da reuterina sobre os microrganismos: (i) a reuterina seria capaz de inibir a ribonucleotídeo redutase ou/e (ii) a ação da reuterina estaria relacionada a desencadear um estresse oxidativo na célula bacteriana (Schaefer *et al.*, 2010; Gyawali e Ibrahim, 2014). Segundo Langa e colaboradores (2013), apesar da reuterina não estar apta legalmente para ser utilizada como conservante de alimentos, a sua adição pode ocorrer adicionando *L. reuteri* nos alimentos, ou seja, de forma *in situ*.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e os bacteriófagos são vírus que possuem apenas as células bacterianas como hospedeiras, sendo capazes de infectá-las, de replicar em seu interior e, ainda, de lisá-las (caso sejam fagos que fazem o ciclo lítico) (Mills,

Ross e Hill, 2017). Devido a essa capacidade, podem ser utilizados para tratar doenças causadas por infecções bacterianas, o que é conhecido como fagoterapia. Estes também podem ser utilizados no biocontrole de patógenos alimentares e microrganismos deterioradores (Bai *et al.*, 2016).

Já existem produtos no mercado aprovados pela FDA para esse propósito, como o *ListShield (Intralytix Inc., Baltimore, MD, EUA)* e *EcoShield (Intralytix)*. Ambos possuem uma combinação de mais de um tipo de bacteriófago, ou seja, são produtos contendo coquetéis de fagos, o que pode possuir vantagens como: (i) a ampliação do espectro antimicrobiano e (ii) a redução do risco de resistência a fagos. Dependendo dos fagos escolhidos, pode ocorrer uma redução ao invés de ampliação do espectro microbiano, devido a uma possível competição (Bai *et al.*, 2016; Mills, Ross e Hill, 2017).

Para a conservação de alimentos os fagos podem, por exemplo, ser utilizados antes da produção do alimento ou produto alimentício, ou seja, durante o crescimento das plantas de forma a protegê-las de doenças. Estes também podem ser utilizados após a produção do alimento através de uma aplicação direta de fagos no mesmo, adição em embalagens ou ainda, como um biosanitizante nas indústrias de alimento (Mills, Ross e Hill, 2017).

Além disso, a principal responsável pela lise celular bacteriana por bacteriófagos é a enzima endolisina, capaz de hidrolisar a peptidoglicana da parede celular e, por isso, é sugerida como um possível novo agente para o biocontrole de patógenos alimentares bacterianos. Como as bactérias Gram-negativas possuem a membrana externa, essa enzima seria mais eficaz em Gram-positivas. Para contornar esse fato, tem sido estudado o possível uso de uma endolisina modificada geneticamente, que seja capaz de atuar sobre bactérias Gram-negativas também (Bai *et al.*, 2016).

O uso dos antimicrobianos de origem microbiana está diretamente ligado ao conceito de biopreservação que, segundo Ross, Morgan e Hill (2002), refere-se ao uso de microrganismos ou ainda, de seus metabólitos para a extensão do tempo de vida e também do aprimoramento da segurança do alimento.

Metabólitos microbianos como as bacteriocinas despertam interesse de exploração para a biopreservação. As bacteriocinas são consideradas antimicrobianos naturais com origem microbiana (bactérias e arqueas) e seu uso já têm beneficiado as indústrias de alimentos há várias décadas (Gyawali e Ibrahim, 2014, Mills, Ross e Hill, 2017 e Quinto *et al.*, 2019). Os próximos itens desse documento irão descrever de forma mais ampla as bacteriocinas, o motivo pelo qual há um grande interesse no uso delas nos alimentos e suas possíveis aplicações no mesmo.

Capítulo 3. Bacteriocinas

3.3.1 Aspectos gerais

As bacteriocinas podem ser definidas como: substâncias multifuncionais de natureza proteica, produzidas nos ribossomos por procariotos e que possuem atividade antimicrobiana em certas concentrações (Chikindas *et al.*, 2018). Segundo Chen e Hoover (2003), esses antimicrobianos naturais possuem um papel fundamental na dinâmica da população bacteriana, embora seja difícil entender tal papel de forma plena porque as interações das bacteriocinas no campo ecológico e evolucionário são complexas.

Alguns dos microrganismos capazes de produzir bacteriocinas são: bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e também algumas arqueas. Elas podem atuar contra espécies filogeneticamente próximas, possuindo um limitado espectro de ação ou contra espécies de outros gêneros bacterianos, o que caracteriza um amplo espectro de ação (Rameshkumar *et al.*, 2016). Além desse antagonismo bacteriano, as bacteriocinas podem possuir ação contra vírus. Por exemplo, algumas bacteriocinas produzidas por estirpes de *Lactococcus lactis* e *Enterococcus durans* mostraram ação contra os vírus causadores da poliomielite e herpes tipo 1 (Cavicchioli *et al.*, 2018).

As bacteriocinas também podem atuar contra fungos, por exemplo, Tumbariski e colaboradores (2019) mostraram que a estirpe *Bacillus methylotrophicus* BM47 era capaz de produzir uma bacteriocina com capacidade de inibir *Penicillium sp.* Além disso, certas bacteriocinas podem ter ação contra protozoários. A enterocina AS-48 apresentou atividade contra *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (Martín-Escolano *et al.*, 2019).

Os genes relacionados à produção das bacteriocinas organizam-se em *clusters* e, geralmente, são compostos de: (i) genes estruturais, que contém as informações genéticas para a tradução das bacteriocinas inativas chamadas de pré-bacteriocinas; (ii) genes de modificação, maturação e transporte (que codificam para os sistemas de transporte do tipo ABC das bacteriocinas) e (iii) genes de imunidade, que possuem informação para a tradução de proteínas de imunidade (Todorov, 2009; Mills, Ross e Hill, 2017).

Em relação à maioria das bacteriocinas, sua síntese ocorre na forma inativa contendo um peptídeo precursor que apresenta uma sequência líder que, necessariamente, é retirada através de ação proteolítica para sua ativação. Existem algumas exceções, como o grupo das bacteriocinas sem a sequência-líder (Chen e Hoover, 2003; Zimina *et al.*, 2020). Essas

substâncias, em sua maioria, são exportadas do meio intracelular para o extracelular através de transportadores do tipo ABC, que são compostos de domínios transmembrana (TMD) e domínios ligantes de nucleotídeos (NBD). Diversos tipos de transportadores do tipo ABC que podem atuar de diferentes formas: (i) como transportador; (ii) como responsável pela clivagem do precursor da bacteriocina, levando à formação da bacteriocina madura e também, (iii) como um sistema de imunidade (Beis e Rebuffat, 2019).

O sistema de imunidade pode ser considerado fundamental para a célula bactericinogênica. Isso porque, segundo Beis e Rebuffat (2019), confere proteção contra a ação da bacteriocina sobre a própria célula produtora e pode ser atribuído, não somente a certos tipos de transportadores do tipo ABC, como também às proteínas de imunidade.

3.3.2 Classificação e mecanismos de ação das bacteriocinas

Já foram descritas várias bacteriocinas que possuem diferentes estruturas e mecanismos de ação. Segundo Dykes (1995), existe uma ampla diversidade de bacteriocinas com diferentes estruturas moleculares, o que pode representar uma divergência evolutiva resultado da concorrência entre as diferentes espécies. Essa hipótese feita por Dykes (1995) pode ser uma possível explicação para a diversidade das bacteriocinas que são divididas em classes e subclasses de acordo com suas características físico-químicas em comum e seu microrganismo produtor.

A partir da revisão de estudos na literatura sobre as classificações das bacteriocinas, feita por Zimina e colaboradores (2020), foi possível verificar que as bacteriocinas produzidas por arqueas podem ser agrupadas em: halocinas e sulfolobocinas. Já as produzidas por bactérias Gram-negativas podem ser divididas em: colicinas, que contém as que são proteínas sensíveis ao calor, com massa molecular entre 30 e 80 KDa produzidas por *E-coli*; colicinas-like, que são semelhantes às colicinas mas são produzidas por outras bactérias Gram-negativas ao invés de *E-coli*; tailocinas, que são proteínas maiores que 20-100 KDa; e microcinas, que contém as bacteriocinas que são peptídeos com massa molecular inferior a 10 KDa (Simons, Alhanout e Duval, 2020).

As produzidas por bactérias Gram-positivas podem ser classificadas em três grandes classes, que são: (a) classe I (lantibióticos), que contém as bacteriocinas que possuem modificações pós-traducionais e que possuem em sua estrutura resíduos de lantionina e/ou metil-lantionina; (b) Classe II que abriga peptídeos com pesos moleculares inferiores a 10 KDa sem modificações pós-traducionais e (c) Classe III, que contém as bacteriocinas constituídas de

proteínas termolábeis, subdivididas em duas classes; uma contendo as que são consideradas líticas, ou seja, capazes de lisar as células-alvo e outras contendo as não-líticas (Montalban-Lopez *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2018; Zimina *et al.*, 2020).

Em relação às bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, existem autores que consideram outras classificações, que podem incluir as classes IV, V e até VI. Farias (2016), por exemplo, considerou as classes IV, que abrigam as bacteriocinas circulares, e V, que contém as bacteriocinas circulares ou não, mas que possuem ligações tioéter entre o carbono-alfa e o enxofre da cisteína. Segundo de Freire Bastos e colaboradores (2020), os tiopeptídeos (peptídeos macrocíclicos ricos em enxofre) podem ser agrupados em uma nova classe, que seria a classe VI (**Quadro 1**).

As bacteriocinas podem atuar de maneiras diferentes sobre células vegetativas e esporos. Frente às células vegetativas, as bacteriocinas podem atuar das seguintes formas: (i) inibindo a síntese da parede celular; (ii) formando poros e (iii) levando a inibição da parede e formando poros e ainda, (iv) interferindo no metabolismo de proteínas, DNA e RNA da célula-alvo (Cotter, Ross e Hill, 2013; Egan *et al.*, 2016). Em relação à atuação frente a endósporos, há um menor conhecimento sobre a sua interação com bacteriocinas quando comparado às células vegetativas. Apesar disso, sabe-se que a atuação das bacteriocinas sobre esses pode ser esporocida, agindo sobre os esporos que não germinaram (dormentes). Isso acontece sem que haja a germinação para que a bacteriocina atue. Além disso, pode ser esporostática, podendo atuar sobre os esporos dormentes ou que germinaram, mas nesse caso é necessário que o esporo germine para que a bacteriocina impeça seu crescimento (Egan *et al.*, 2016).

Quadro 1- Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas (Duarte, 2016; Coelho, Duarte e Bastos 2017; Farias, 2018; Francisco, 2019).

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	SUBCLASSES	EXEMPLOS (REFERÊNCIAS)
Classe I (lantibióticos)	Pequenos peptídeos (< 5 kDa), geralmente, termoestáveis, contendo ligações-tioéter raras com o carbono-β	Ia: peptídeos processados pelas enzimas de modificação LanB e LanC Ib: peptídeos processados pela enzima bifuncional LanM Ic: lantibióticos de dois componentes, processados por LanM Id: peptídeos contendo labionina, processados por LanKC	Nisina (Mattick, Hirsch e Berridge, 1947) Mersacidina (Brötz <i>et al.</i> , 1995) Lacticina 3147 (Martin <i>et al.</i> , 2004) Labirintopeptina A1 (Féris <i>et al.</i> , 2013)
Classe II	Pequenos peptídeos (< 10 kDa), geralmente, termoestáveis, que não apresentam ácidos aminados modificados	IIa: peptídeos lineares do tipo-pediocina, ativos contra listéria IIb: bacteriocinas de dois peptídeos lineares IIc: bacteriocinas de um único peptídeo linear do tipo não-pediocina e/ou com sequência-líder dependente do sistema <i>sec</i> IId: peptídeos lineares únicos, não-processados IIe: peptídeos formados por uma degradação específica de proteínas maiores IIf: bacteriocinas compostas por mais de dois peptídeos lineares	Pediocina PA-1 (Rodríguez, Martínez e Kok, 2002) Lactacina F (Abee, Klaenhammer e Letellier, 1994) Lactococcina A (Holo, Nilssen e Nes, 1991) Aureocina A53 (Netz <i>et al.</i> , 2002) Propionicina F (Brede <i>et al.</i> , 2004) Aureocina A70 (Netz <i>et al.</i> , 2001)
Classe III	Proteínas maiores do que 10 kDa e, geralmente, termolábeis	IIIa: bacteriolisinas IIIb: bacteriocinas não-líticas	Lisostafina (Bastos, Coutinho e Coelho, 2010) Helveticina J (Thompson, Collins e Mercer, 1996)

Quadro 1- Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas (Duarte, 2016; Coelho, Duarte e Bastos 2017; Farias, 2018; Francisco, 2019) (continuação).

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	SUBCLASSES	EXEMPLOS (REFERÊNCIAS)
Classe IV	Pequenos peptídeos cíclicos e termoestáveis, sem ácidos aminados modificados	IVa: peptídeos catiônicos ($pI > 10$) e relativamente hidrofóbicos IVb: peptídeos com pI variável (3,8 a 9,5), altamente hidrofóbico e com significativa similaridade entre suas sequências de ácidos aminados	Enterocina AS-48 (Maqueda <i>et al.</i> , 2004) Gassericina A (Kawai <i>et al.</i> , 2004)
Classe V (“sactibióticos”)	Pequenos peptídeos (< 5 kDa) modificados após a tradução, contendo ligações-tioéter raras com o carbono-alfa do ácido aminado receptor	Va: peptídeos circulares Vb: peptídeos lineares Vc: “sactibióticos” compostos por dois peptídeos	Subtilosina A (Kawulka <i>et al.</i> , 2003) Thurincina H (Lee, Churey e Worobo, 2009) Thuricina CD (Rea <i>et al.</i> , 2010)
Classe VI (tiopeptídeos)	Pequenos peptídeos (< 5 kDa) macrocíclicos, apresentando um anel central de seis membros contendo nitrogênio, presença de cauda de tamanho variável e resíduos de ácidos aminados extremamente modificados após a tradução	VIa: peptídeos do tipo-tiostrepton A VIb: peptídeos do tipo-nosieptídeo VIc: peptídeos do tipo-tiocilinas VId: peptídeos do tipo-GE2270 A VIe: peptídeos do tipo-ciclotiazomicinas VI f: peptídeos do tipo-berninamicinas	Tiostrepton A (Dutcher e Vandeputte, 1955) Nosieptídeo (Prange <i>et al.</i> , 1977) Tiocilina I (Shoji <i>et al.</i> , 1976) GE2270 A (Selva <i>et al.</i> , 1991) Ciclotiazomicina A (Aoki <i>et al.</i> , 1991) Berninamicina A (Liesch <i>et al.</i> , 1976)

KDa - kilodaltons.

3.3.3 Usos biotecnológicos das bacteriocinas

As bacteriocinas podem vir a ser utilizadas para diferentes finalidades. Podem ser uma alternativa aos antimicrobianos usados no tratamento de infecções causadas, por exemplo, por patógenos multirresistentes aos antibióticos de escolha. Podem constituir novos antivirais devido ao fato de algumas serem capazes de atuar sobre vírus como o da poliomielite e herpes tipo 1 (Dridier *et al.*, 2016). Elas podem atuar na regulação do microbioma intestinal e no crescimento de plantas atuando, por exemplo, como um fator de sinalização para seu crescimento. Como também, no tratamento de câncer atuando de maneira específica frente às células tumorais (Cavicchioli *et al.*, 2018).

As bacteriocinas podem contribuir para a conservação dos alimentos, atuando contra microrganismos patogênicos e deterioradores; para o cuidado íntimo da mulher como um possível tratamento de vaginose; no tratamento de infecções orais e da pele; na prevenção da gravidez, atuando como espermicidas; e ainda, podem ser utilizadas no tratamento de mastites, na área veterinária (Ahmad *et al.*, 2017; Negash e Tsehai, 2020).

É possível verificar que houve um aumento no número de pesquisas relacionadas às diferentes aplicações biotecnológicas das bacteriocinas nos anos entre 2004 e 2015 (López-Cuellar, Rodríguez-Hernández e Chavarría-Hernández, 2016). Tais estudos se concentraram na conservação de alimentos (**Figura 6**), o que pode ser um reflexo da busca dos consumidores por alimentos menos industrializados e que apresentam conservantes naturais.

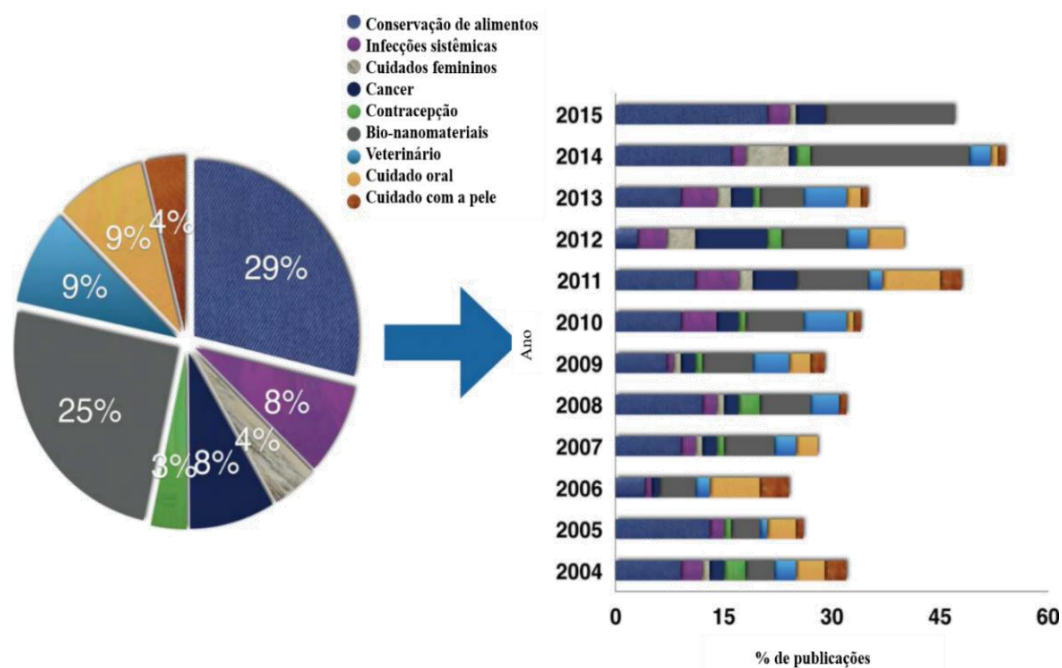


Figura 5. Principais pesquisas no desenvolvimento do uso de bacteriocinas. Adaptado de López-Cuellar, Rodríguez-Hernández e Chavarría-Hernández, 2016.

Capítulo 4. Bacteriocinas como bioconservantes

Segundo Abbasiliasi e colaboradores (2017), a aplicação das bacteriocinas na indústria de alimentos aumentou conforme o crescimento da preocupação em relação ao uso de conservantes químicos que podem vir a ter efeitos negativos sobre a saúde humana. Essa afirmação pode indicar o quanto as bacteriocinas já são consideradas como uma alternativa para a substituição ou redução do uso dos conservantes químicos. A bacteriocina nisina, por exemplo, já é usada há décadas como bioconservante em alimentos (Cleveland *et al.*, 2001; Silva, Silva e Ribeiro, 2018).

Como conservantes naturais, as bacteriocinas garantem não só um aumento da vida útil do produto alimentício por sua ação contra microrganismos deterioradores, mas também uma diminuição do risco de contaminação alimentar por patógenos e a segurança de que seu consumo não irá causar malefícios à saúde (Gálvez *et al.*, 2007). O fato de atuarem contra os microrganismos deterioradores de alimentos faz com que, uma vez usadas como conservantes, as bacteriocinas reduzam os impactos econômicos pela deterioração de alimentos causada por esses microrganismos. Além disso, podem atuar contra células vegetativas e esporos (Egan *et al.*, 2016), sendo possível aplicá-las nos alimentos e produtos alimentícios de diferentes formas.

3.4.1 Aplicação das bacteriocinas nos alimentos e produtos alimentícios

É desejável que as bacteriocinas para a aplicação em alimentos sejam: seguras para o consumidor; possuam estabilidade térmica; a capacidade de atuar sobre uma ampla faixa de pH e serem resistentes à atuação de enzimas que fazem parte do alimento ou produto alimentício. Em relação às estirpes produtoras, é almejado que possuam a capacidade de produzir bacteriocinas em concentrações suficientes para inibir microrganismos indesejáveis do produto alimentício, e ainda, serem aptas a crescer no meio de cultura selecionado (Johnson *et al.*, 2018). Importante ressaltar que o uso das bacteriocinas não é substituto para as boas práticas de fabricação de um produto (Cotter, Hill e Ross, 2005), assim como, de que há diferentes formas de aplicar/empregar esses antimicrobianos naturais com intuito de conservar alimentos.

As bacteriocinas para uso industrial podem ser aplicadas: usando a cultura produtora diretamente no alimento como cultura iniciadora ou secundária; com a adição da bacteriocina diretamente no alimento de forma purificada parcialmente ou totalmente; ou ainda, com a adição do sobrenadante livre de células (de forma *ex situ*), que pode ser produzido em meios de cultura alternativos como o soro de leite e a milhocina. Por outro lado, as bacteriocinas podem ser utilizadas adicionadas em embalagens e como sanitizantes para combater microrganismos indesejáveis em superfícies e maquinário (Gálvez *et al.*, 2007; Balciunas, 2013; Mills, Ross e Hill, 2017; Farias, 2018).

Bacteriocinas podem ser aplicadas em ação conjunta com outro método de conservação de alimentos, que pode ser natural ou não, como o uso de bacteriocinas somados a extratos de plantas que contêm antimicrobianos naturais e uso de bacteriocinas somado ao uso de calor (Egan *et al.*, 2016). Segundo Deegan (2006), as bacteriocinas podem ser utilizadas com outro método de conservação de alimentos para uma maior eficiência na prevenção do crescimento de patógenos alimentares e deterioradores. Elas podem ser utilizadas em uma combinação de bacteriocinas no alimento, onde cada uma apresentaria um mecanismo de ação diferente (de Freire Bastos, Coelho e Santos, 2015); ou podem ser aplicadas em conjunto, por exemplo, na elaboração de um produto alimentício usando bacteriocinas *in situ* e incorporadas em embalagens e/ou em um maquinário que é higienizado com um sanitizante feito com bacteriocinas.

Em relação aos tipos de aplicações possíveis mencionados, o uso de culturas iniciadoras bactericinogênicas é uma vantagem em relação ao uso das culturas iniciadoras não-produtoras. Isso porque, além de iniciarem um processo fermentativo, estas estirpes irão secretar bacteriocinas que irão inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. Adicionalmente, o

uso de culturas secundárias produtoras de bacteriocinas pode apresentar vantagem em relação às não-produtoras, porque essas bacteriocinas podem atuar sobre os microrganismos da cultura primária, inibindo-os. Assim, é possível acelerar a maturação de produtos lácteos (Bali *et al.*, 2016).

A utilização de bacteriocinas purificadas na conservação de alimentos pode ter uma aplicação limitada devido ao custo de purificação, o qual pode ser de até 30 % do total de produção da bacteriocina (Bali, Panesar e Bera, 2016; Abbasiliasi e colaboradores, 2017). Isso pode levar a necessidade de utilização de meios alternativos de produção com intuito de eliminar essa etapa de purificação. Esses meios podem ser resíduos das indústrias de alimentos como o soro de leite. O sobrenadante livre das células produtoras, que contém bacteriocinas, pode ser adicionado diretamente no alimento e ser obtido por centrifugação.

A utilização de um sobrenadante livre de células que contém bacteriocinas encaixa-se no conceito de posbiótico. Segundo Moradi e colaboradores (2020), há diferentes definições para esse conceito, que ainda é considerado novo, por exemplo, podem ser considerados fatores bioativos solúveis ou metabólitos produzidos por um microrganismo durante seu crescimento. Os posbióticos também podem ser considerados compostos celulares ou substâncias produzidas por ação de microrganismos no alimento como peptídeos antimicrobianos.

Encontrar cepas que produzem naturalmente uma grande quantidade de bacteriocinas é desejável para uma produção de bacteriocinas. Entretanto, uma alternativa a isso é a modificação genética de estirpes para obtenção dessa alta produção desses antimicrobianos, ou ainda, de bacteriocinas quiméricas (Johnson *et al.*, 2018).

Em relação ao espectro de ação das bacteriocinas desejáveis para aplicação em alimentos ou produtos alimentícios, Egan e colaboradores (2016) sugerem que um amplo espectro de ação de uma bacteriocina é uma característica desejável para o uso em alimentos. Por outro lado, para Cotter, Hill e Ross (2005), a aplicação de bacteriocinas com limitado espectro de ação pode ser interessante para a indústria de alimentos, porque podem favorecer o crescimento de determinada população microbiana em detrimento de outra (exclusão competitiva). Durante o processo de fabricação de queijos, por exemplo, pode ocorrer uma exclusão competitiva, pois segundo Deegan e colaboradores (2006), as bacteriocinas podem ser utilizadas para “direcionar” ou influenciar o crescimento de bactérias que não são as ácidos lácticas pertencentes à cultura iniciadora. Essas “não-BAL”, durante a produção do queijo, podem tanto estar relacionadas a efeitos positivos no sabor do produto quanto a defeitos no queijo, como a formação de fendas. Dessa maneira, as bacteriocinas poderiam ser utilizadas na

fabricação do queijo para controlar o crescimento dessas bactérias e, conseqüentemente, auxiliar na não formação dessas fendas para a produção de queijos de melhor qualidade.

A partir disso, fica evidenciado que as bacteriocinas de amplo e limitado espectro de ação possuem seu valor para a bioconservação de alimentos, sendo sua utilização a depender da finalidade desejada pelo fabricante do produto alimentício.

3.4.2 Atrativos no uso de bacteriocinas produzidas por BAL na bioconservação

Segundo Field, Ross e Hill (2018), a atuação limitada da nisina em determinado pH e sua insolubilidade em determinado meio enfatizam a necessidade de haver outros compostos (outras variantes, como a nisina Z) que sejam mais estáveis para o uso como conservantes. Usando esse mesmo raciocínio, ter outras bacteriocinas que possam ser utilizadas como conservantes naturais pode ser muito útil para a biopreservação de alimentos.

Diferentes microrganismos podem produzir bacteriocinas, entretanto, segundo Abbasiliasi e colaboradores (2017), há uma preferência no uso industrial desses compostos produzidos por bactérias ácido lácticas (BAL). Muitas bacteriocinas produzidas por BAL vêm sendo descobertas e caracterizadas ao longo dos últimos anos, e muitas dessas, possuem potencial para uso como bioconservantes, como a enterocina P produzida por *Enterococcus faecium* E86, que é capaz de atuar contra *Listeria monocytogenes*, considerada um importante patógeno alimentar (Miguel, de Castro e Leite, 2008; Farias, 2018).

As BAL são um grupo de bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos, aerotolerantes e que fermentam uma variedade de açúcares, cujo produto majoritário desse processo é o ácido láctico (Sauer *et al.*, 2017). Entre as vantagens no uso das bacteriocinas produzidas por BAL como bioconservantes em alimentos, está o fato de geralmente possuírem o status GRAS pela FDA, significando que possuem o reconhecimento de que são seguras para seu uso como aditivos nos alimentos (Gálvez *et al.*, 2007).

As bacteriocinas podem apresentar atividade inibitória em concentrações nanomolares e podem ser produzidas diretamente no alimento (*in situ*), pois muitas BAL já são consideradas GRAS e usadas como culturas iniciadoras e/ou secundárias, não interferindo nas características organolépticas do alimento ou produto alimentício final (Field, Ross e Hill, 2018). Outro fato que pode ser considerado um atrativo no uso das BAL é que possuem muitas bacteriocinas que são codificadas por genes presentes em plasmídeos, o que pode facilitar a manipulação genética a fim de aumentar a sua produção pela estirpe. Além disso, outro fator para a escolha de BAL ao invés de outros microrganismos bacteriocinogênicos, é que essas podem contribuir para a

conservação do alimento, não só com a produção de bacteriocinas, mas também pela redução do pH do meio, produção de diacetil e peróxido de hidrogênio (**Figura 6**) (Egan *et al.*, 2016).

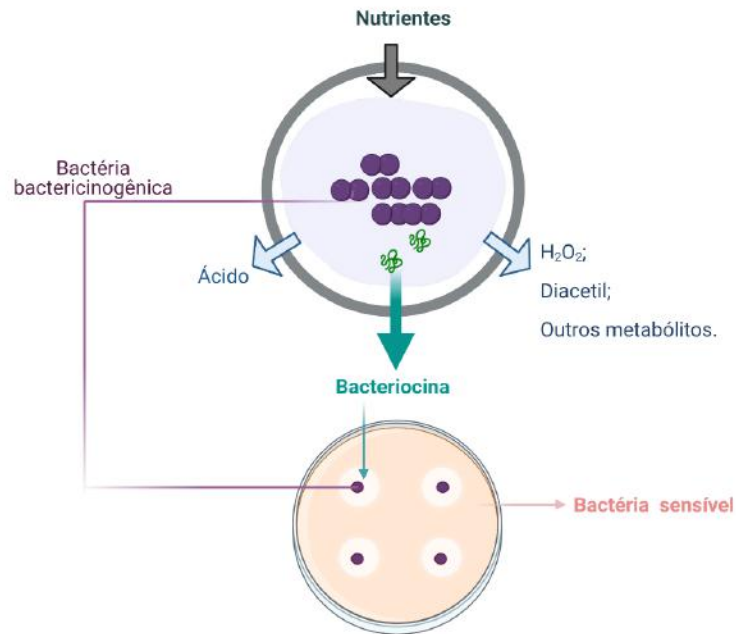


Figura 6. Visualização de halos de inibição causados pela presença de bacteriocinas. A detecção desses halos pode ser verificada através do não crescimento da bactéria indicadora/ sensível (de cor rosa). Modificado de Deegan *et al.*, 2006. Recriado com BioRender.com.

O fato de as BAL serem Gram-positivas reduz a necessidade de uma purificação rigorosa de suas bacteriocinas, como no caso das produzidas por Gram-negativas que possuem o lipopolissacarídeo (LPS) como um resíduo contaminante, o qual é um fator de virulência bacteriano (Johnson *et al.*, 2018). Outras características que são desejáveis e que podem vir a ser encontradas em BAL, incluem a produção de múltiplas bacteriocinas que podem ter diversos mecanismos de ação e ainda, um amplo espectro de atuação contra vários microrganismos patogênicos e deterioradores alimentares (Egan *et al.*, 2016).

Os metabólitos das BAL (assim como as próprias BAL) já são consumidos em grandes quantidades há anos sem efeitos adversos aos seres humanos, o que leva a uma preferência no uso das bacteriocinas produzidas por esse grupo de bactérias em alimentos em detrimento de outros (Cleveland *et al.*, 2001; Chen e Hoover, 2003). Outro ponto positivo é que muitas BAL bacteriocinogênicas foram isoladas de alimentos. Por isso, podem ser consideradas ideais para o uso nos alimentos (Deegan *et al.*, 2006).

Segundo Field, Ross e Hill (2018) as bacteriocinas de maneira geral são atóxicas contra as células eucarióticas. Importante ressaltar que em relação a essa segurança do uso das

bacteriocinas, seu potencial tóxico depende da biodisponibilidade da bacteriocina e de sua absorção após a ingestão (Soltani *et al.*, 2021).

Em geral, quando as bacteriocinas são ingeridas, possuem pouca influência na microbiota intestinal (quando adicionadas no alimento), porque são sensíveis à atuação de proteases e sais biliares presentes no trato gastrointestinal, perdendo sua atividade inibitória. (**Figura 7**). Isso pode ocorrer devido à natureza proteica das bacteriocinas que garante que uma vez usadas como conservantes naturais, não ocasionem disbiose e seus sintomas decorrentes (Gálvez *et al.*, 2007).

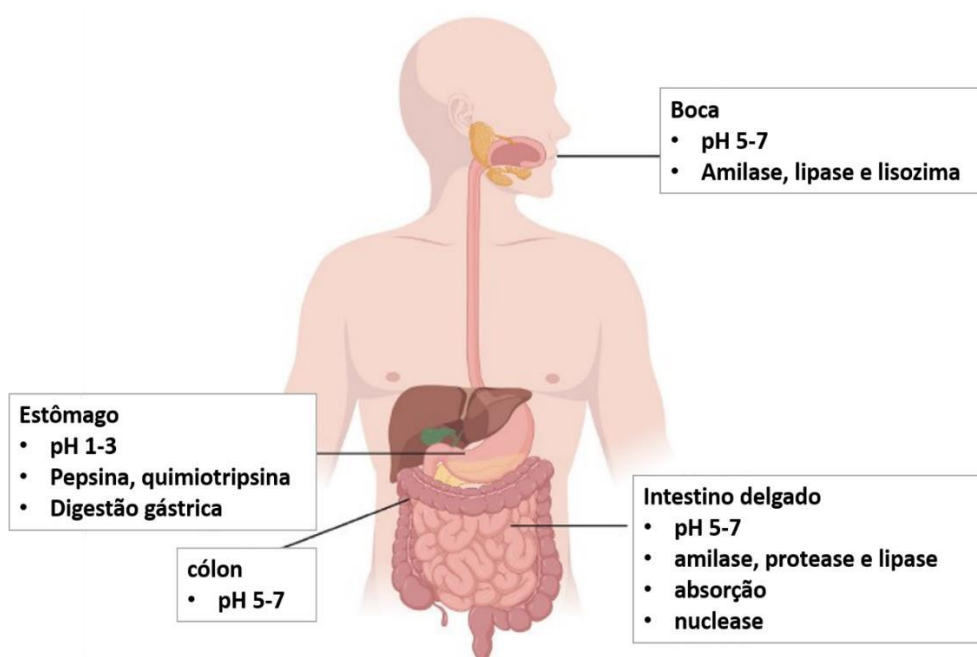


Figura 7. Barreiras do trato gastrointestinal humano que são capazes de levar a perda da atividade de uma bacteriocina. A natureza proteica das bacteriocinas permite que proteases como a pepsina e um pH ácido, presentes no trato gastrointestinal, levem a uma inativação da bacteriocina. Com isso, o uso *ex situ* desses antimicrobianos não apresenta um risco para o desencadeamento de disbiose intestinal. Adaptado de Soltani *et al.*, 2021.

Para a utilização das bacteriocinas é necessário que haja ensaios de toxicidade para avaliar o efeito das mesmas no corpo humano. Os ensaios de toxicidade aguda são aqueles que determinam os efeitos adversos de um produto após uma exposição, que pode ocorrer uma ou mais vezes em um curto período de tempo, e podem determinar a dose letal capaz de inibir 50% da cultura celular (LD50). Essa avaliação é necessária pois, apesar da maioria das bacteriocinas descritas não possuírem efeitos negativos sobre células eucariotas, como a nisina (uma bacteriocina já comercialmente disponível), existem aquelas que podem ser tóxicas. Isso

evidencia a importância de mais estudos sobre a exposição desses antimicrobianos naturais e seus efeitos sobre a saúde dos consumidores (Soltani *et al.*, 2021).

A citolisina, produzida por certas estirpes de *E. faecium*, possui toxicidade sobre células eucariotas de certas espécies (como eritrócitos). Embora ainda não se saiba como exatamente ocorre o mecanismo de ação da citolisina, devido à divergência nos resultados de estudos *in vitro* sobre esse assunto, é evidente que essa bacteriocina contribui para a ocorrência de *E. faecium* no sangue (Coburn e Gilmore, 2003). A listeriolisina S (LLS), produzida por certas estirpes de *Listeria monocytogenes* (patógeno alimentar), é outro exemplo de bacteriocina indesejável para uso em alimentos. Há indícios de que essa bacteriocina desempenha um papel importante para a infecção causada por esse patógeno, devido a sua ação contra espécies relacionadas a um papel protetor da microbiota, que seriam espécies competidoras, o que poderia favorecer a colonização intestinal por esse patógeno (Quereda *et al.*, 2017).

Em relação ao uso de bacteriocinas adicionadas com o sobrenadante livre de células, ou seja, como um posbiótico, ainda não há evidência de riscos associados ao seu consumo, mas sabe-se que como não haveria microrganismos, não haveria o risco de infecção. Apesar disso, há a necessidade de estudos para determinar os possíveis efeitos indesejáveis dos posbióticos (Moradi *et al.*, 2020). Com isso, fica claro como é imprescindível avaliar a toxicidade de cada tipo de bacteriocina sobre as células eucariotas, para que possam ser utilizadas nos alimentos. Além disso, outro ponto necessário a ser estudado é a possível existência de resistência à atuação das bacteriocinas nos alimentos que limitaria sua eficiência como bioconservante.

3.4.3 Mecanismos de resistência às bacteriocinas e seu impacto na bioconservação

Ainda não existe um consenso sobre uma definição dos níveis de resistência às bacteriocinas, ou seja, o que pode ser considerada uma alta, moderada ou baixa resistência a uma determinada bacteriocina (de Freire Bastos, Coelho e Santos, 2015). Em função disso, a determinação da existência ou não de resistência, por parte dos microrganismos-alvo, é de fundamental importância para a aplicação de uma bacteriocina e a garantia da segurança do alimento (Kumariya *et al.*, 2019).

Segundo Cleveland e colaboradores (2001), quando um novo conservante é considerado seguro e eficiente, é essencial determinar por quanto tempo ele mantém sua ação no alimento, seja por sua degradação natural ou existência de uma população de microrganismos resistentes, garantindo assim a segurança ou qualidade do produto.

A membrana externa presente em bactérias Gram-negativas é naturalmente um empecilho para a atuação das bacteriocinas, porque impede o acesso dessas moléculas aos seus receptores presentes na membrana celular, como os lipídeos II e, conseqüentemente, a formação de poros e/ou o bloqueio da síntese da parede celular (Egan *et al.*, 2016). Apesar disso, o uso de agentes que desestabilizam a membrana externa, como o EDTA, podem permitir o acesso novamente da bacteriocina que resolveria este problema (de Freire Bastos, Coelho e Santos, 2015). O uso conjunto das bacteriocinas com outro método de conservação de alimentos também pode aumentar sua eficiência (Deegan, 2006).

Em relação às bactérias Gram-positivas, alguns dos mecanismos de resistência são: (i) resistência inata, que inclui a degradação da bacteriocina que pode ocorrer pela ação de proteases; o mimetismo imunológico; condições ambientais, como fase do crescimento de uma estirpe e também, alterações no envelope bacteriano como a adição de D-alanina nos ácidos lipoteicóicos presentes na membrana, levando a redução de sua carga negativa e a menor interação de bacteriocinas; (ii) mecanismos de resistência adquirida, como aqueles que levam à alterações na membrana e mutações que levam a uma redução do nível de receptores para as bacteriocinas (de Freire Bastos, Coelho e Santos, 2015).

Apesar de haver vários mecanismos de resistência possíveis, há estratégias no uso de bacteriocinas que podem prevenir a resistência às mesmas, como o uso de uma bacteriocina somado ao de outro método de conservação de alimentos e/ou a utilização de mais de uma bacteriocina, que tenha diferentes mecanismos de ação (de Freire Bastos, Coelho e Santos, 2015). Outra possibilidade é o uso de uma determinada bacteriocina que possua mais de um mecanismo de ação, como a nisina, que pode inibir a síntese da parede celular e/ou levar a formação de poros na membrana (Cotter, Hill e Ross, 2005; Egan *et al.*, 2016). Essas estratégias acarretam na necessidade de reparo de vários danos causados por diferentes mecanismos de ação e, conseqüentemente, trazem um elevado custo energético para a célula, levando-a a exaustão e morte e ainda, a uma menor probabilidade de sobrevivência de microrganismos, o que inclui os que podem ser resistentes a uma das bacteriocinas utilizadas (Gálvez *et al.*, 2007).

3.4.4 Produção de bacteriocinas para bioconservação de alimentos

Existem alguns produtos disponíveis no mercado que contêm bacteriocinas como: Nisaplin®; MAYNISIN™; SAPRESH™ (que contêm nisina); ALTA™ 2431 (que contém pediocina PA-1); Bactoferm™ B-SF-43 e Bactoferm™ B-2 (que possuem leucocina e sakacina, respectivamente); entre outros (Bali *et al.*, 2016; Chikindas *et al.*, 2018). A única empresa brasileira produtora de nisina é a Danisco Brasil Ltda, fabricante do Nisaplin®. A elaboração desse produto ocorre através da adição de estirpes de *Lactococcus lactis* (bactericinogênicas) em um meio contendo fonte de energia e extrato de levedura para essas bactérias, permitindo que ocorra a fermentação. Após o final desse processo fermentativo as células produtoras são retiradas e o concentrado final contendo as bacteriocinas é convertido em um pó pela técnica de *spray dryer*. Apesar de haver poucos produtos para comercialização, muitas patentes de bacteriocinas já foram depositadas (pelo menos 400) (Oliveira, 2013; EFSA, 2017a). Isso indica que existe o interesse na busca por novas que possam ser usadas como bioconservantes.

Um dos grandes desafios da utilização das bacteriocinas na indústria é a sua produção em larga escala. Nesse contexto, alguns parâmetros podem direcionar a produção das bacteriocinas, como a seleção de estirpes que produzem altas quantidades de bacteriocinas (Johnson *et al.*, 2018). Nessa busca, uma possibilidade de conseguir tais estirpes é modificar geneticamente a bactéria bactericinogênica. Segundo Field, Ross e Hill (2018), a biotecnologia pode tornar mais fácil a produção de bacteriocinas levando ao aumento de sua produção usando uma produção heteróloga desses antimicrobianos, ou seja, adicionando os genes sintéticos de bacteriocinas em outro microrganismo, como uma levedura ou bactéria. Apesar dessa aparente solução que a biotecnologia pode trazer, é necessário saber que segundo Cleveland e colaboradores (2001), a bacteriocina nisina não é considerada natural ou tem seu significado de natural comprometido quando: (i) é aplicada em concentrações que excedem as encontradas em alimentos fermentados, contendo bactérias produtoras de nisina como cultura iniciadora e (ii) quando se utiliza estirpes produtoras de nisina geneticamente modificadas (OGM).

Usando esse mesmo raciocínio de Cleveland e colaboradores (2001), é possível que um produto alimentício contendo bacteriocinas produzidas por uma estirpe bactericinogênica, que foi geneticamente modificada para produzir uma maior quantidade de bacteriocinas nos alimentos, por exemplo, não seja considerado pelos consumidores como um produto natural. Isso pode ocorrer porque, apesar de não haver um consenso do que é naturalidade, o uso de OGM pode não se encaixar na percepção de natural para certos indivíduos (Roman, Sánchez-Siles e Siegrist, 2017), como foi indicado no **Item 3.2.1 (Figura 3)**. Segundo Mills e

colaboradores (2011), uma resistência por parte dos consumidores em relação às bacteriocinas geneticamente modificadas pode limitar sua utilização, embora a medida que a demanda por antimicrobianos naturais e o conhecimento da população sobre as bacteriocinas modificadas aumentam, a utilização dessas pode ocorrer. Contudo, esse ainda é um tópico em debate na literatura que necessita de mais discussões para que seja melhor esclarecido.

Outra etapa para a produção de bacteriocinas é a otimização da produção, ou seja, a utilização das melhores condições possíveis do meio de cultura, como pH, tempo de produção e temperaturas para o crescimento da estirpe produtora (Johnson *et al.*, 2018). Segundo Abbasiliasi e colaboradores (2017), a otimização de uma etapa de fermentação é um processo que exige um longo período de tempo, um alto custo, estudos, padronização do experimento e deve buscar um produto de alta qualidade com baixo custo e tempo necessário para sua obtenção.

3.4.4.1 Fatores que afetam a produção e eficiência das bacteriocinas nos alimentos

A produção de bacteriocinas pode resultar em preparações contendo quantidades significativas destas substâncias, sejam elas purificadas ou parcialmente purificadas. Entretanto, seu uso e ação nas células alvo pode ser influenciado por diferentes fatores que vão determinar a viabilidade ou não do seu uso como conservante.

Os fatores que podem afetar a produção de bacteriocinas pelas estirpes produtoras podem estar relacionados tanto ao meio de cultura, quanto às condições de cultivo. Em relação às condições de cultivo que podem afetar positivamente ou negativamente a produção de bacteriocinas, podem ser citados: pH, temperatura, aeração e agitação (Abbasiliasi *et al.*, 2017).

Um pH extremo (muito ácido ou básico) pode desencadear uma destruição da estrutura da bacteriocina e, com isso, inativá-la, impedindo a comunicação por *quorum sensing* que pode ocorrer através da presença de bacteriocinas no meio e que pode influenciar na produção bactericinogênica (Ge, Kang e Ping, 2019). Ademais, o pH e temperatura impactam a atividade enzimática de microrganismos e, conseqüentemente, impactam o crescimento celular das estirpes produtoras e a produção de bacteriocinas por elas (Sidooski *et al.*, 2019).

A produção de bacteriocinas em larga escala (usando um fermentador industrial) pode ser afetada pela agitação, porque sua presença ou ausência pode influenciar na aeração do meio e, com isso, no crescimento de estirpes produtoras (Abbasiliasi *et al.*, 2017). Cada estirpe bactericinogênica possui uma faixa de temperatura ideal para o seu crescimento máximo.

Em relação ao meio de cultura, os dados obtidos por Sidooski e colaboradores (2019) sobre os parâmetros físicos e nutricionais para a otimização da produção de bacteriocinas, indicaram que suplementar o meio de cultura com fontes de nitrogênio e carbono, podem melhorar ou não a produção de bacteriocinas. Isso sugere que o impacto da quantidade de certos nutrientes no meio para favorecer a produção de bacteriocinas pode ser estirpe dependente.

A revisão acerca de estudos sobre a produção de bacteriocinas na presença de surfactantes, realizada por Abbasiliasi e colaboradores (2017), apontou que esses surfactantes podem influenciar positivamente a produção de bacteriocinas. Isso se deve, provavelmente, por acelerar o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, a quantidade final desses antimicrobianos. Adicionalmente, podem prevenir a agregação das bacteriocinas a proteínas presentes no leite, por exemplo. Sendo assim, em relação ao meio de cultura, a quantidade de nutrientes e surfactantes podem afetar a produção de bacteriocinas. (Arakawa *et al.*, 2009).

A produção das bacteriocinas pode ser influenciada tanto pela perda da capacidade de produção das mesmas pela estirpe bactericinogênica, quanto pela presença de bacteriófagos que sejam capazes de inibir a estirpe produtora, que é sensível a eles (**Figura 8**). Ademais, há outros fatores como: (i) a presença de uma bactéria no meio capaz de atuar antagonicamente a estirpe produtora; (ii) a inadequação da estirpe bactericinogênica como cultura iniciadora e, (iii) a presença de estirpe com baixa capacidade de produção de bacteriocinas (Gálvez *et al.*, 2007).

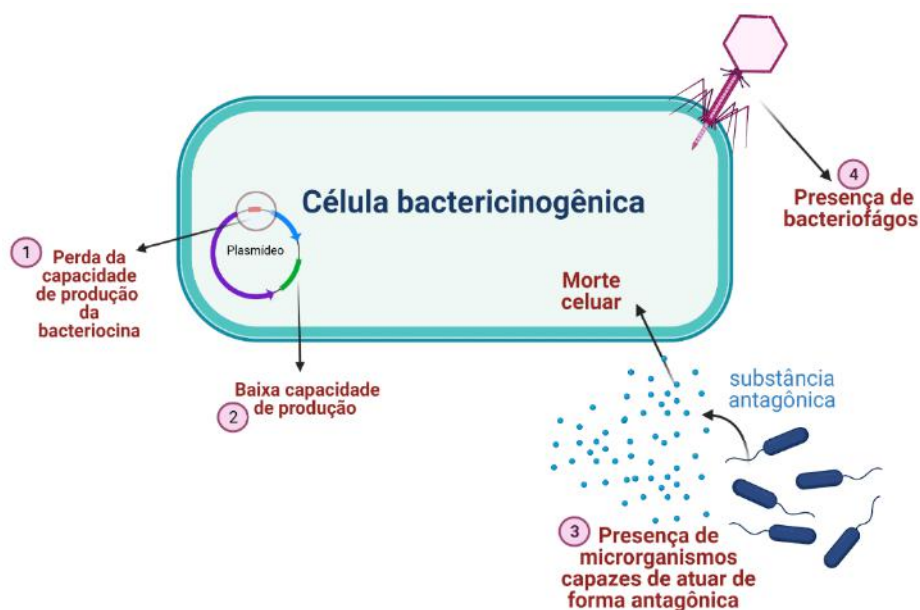


Figura 8. Fatores que podem influenciar a produção de bacteriocina pela estirpe produtora. A perda da capacidade de produção da bacteriocina (por uma mutação ou perda do elemento genético móvel que contém os genes para a síntese do antimicrobiano) e a presença de microrganismos capazes de produzir substância antagonicas podem eliminar ou reduzir a produção de bacteriocinas pela estirpe bactericinogênica. Criado com BioRender.com.

De maneira geral, as bacteriocinas secretadas no alimento podem ser afetadas por condições físicas, químicas e biológicas do mesmo como pH, temperatura e nutrientes. Tais condições podem afetar negativamente o uso das bacteriocinas como bioconservantes, podendo levar a uma interferência da atuação da bacteriocina (Singh, 2018). Isso ocorre, por exemplo, quando há um pH muito ácido, de forma a afetar a estrutura da bacteriocina (devido sua natureza proteica) e, conseqüentemente, sua função/mecanismo de ação. Há ainda, a possível presença de patógenos alimentares com resistência à bacteriocinas no meio e a ocorrência de uma retenção das mesmas pela presença de glóbulos de gordura (Ge, Kang e Ping, 2019). No tocante a presença de certos nutrientes ou componentes no meio, as bacteriocinas podem ser inativadas pela presença de outros aditivos no alimento. O mesmo acontece em relação à menor difusão de certas bacteriocinas no produto alimentício, o que acarreta na distribuição desigual no mesmo, afetando sua eficiência como bioconservante (Singh, 2018).

Outros fatores que podem estar relacionados à eficiência das bacteriocinas como bioconservantes incluem a carga microbiana de patógenos, que podem contaminar o alimento após sua fabricação, e a presença de uma microbiota complexa no alimento que pode afetar negativamente a ação das bacteriocinas se for composta, majoritariamente, de microrganismos resistentes a sua ação, como as bactérias Gram-negativas e produtoras de proteases. O estado fisiológico microbiano, como a presença de esporos, também pode ter relação com a eficiência das bacteriocinas como bioconservantes. Isso ocorre porque os esporos podem ser mais resistentes à ação da bacteriocina do que as células vegetativas (Gálvez *et al.*, 2007).

Cada bacteriocina e suas possíveis variantes podem ter limitações distintas comparadas entre si e essas limitações também podem variar dependendo do alimento. Segundo Ibarra-Sánchez e colaboradores (2020), por exemplo, há diversos fatores que podem limitar o uso da nisina em alimentos derivados do leite como: uma ausência de estabilidade em pH neutro; uma interação com glóbulos de gordura; ligação da nisina (catiônica) com a caseína (aniônica) presente no leite; a presença de cátions divalentes no alimento que impedem o acesso da nisina à membrana plasmática; ou ainda, o potencial de surgimento de resistência à nisina. Sabendo disso, pode-se considerar importante que mais estudos venham a identificar como determinada bacteriocina atua em diferentes matrizes alimentares, principalmente, porque a maioria desses estudos não focam nas propriedades físico-químicas das bacteriocinas nos alimentos, por exemplo, testar se há uma menor adsorção da mesma aos componentes do meio e quais são as melhores condições de solubilidade e estabilidade.

Estratégias podem ser utilizadas para contornar a redução da eficiência das bacteriocinas como bioconservantes causada pela interação indesejada das mesmas com o alimento. A

primeira estratégia é o uso de bacteriocinas bioengenheiradas, pois a manipulação genética pode ser usada para a obtenção de bacteriocinas mais solúveis e estáveis (Mills *et al.*, 2011). Outra estratégia é o uso de metodologias de encapsulação que protegem a bacteriocina e permitem sua liberação gradual no alimento e ainda, a utilização das bacteriocinas em embalagens, pois reduzem o contato da bacteriocina com todo o conteúdo do produto e, conseqüentemente, diminuem o risco de inativação das mesmas (Mill, Ross e Hill, 2017; Soltani *et al.*, 2021). Essa encapsulação pode ocorrer usando: nanopartículas poliméricas (como nanocápsulas e nanoesferas); nanotubos (compostos de uma parede dupla de tubos de carbono); nanofibras e nanolipossomas (vesículas contendo fosfolipídeos) (Lopes e Brandelli, 2018).

3.4.4.2 Meios alternativos para a produção de bacteriocinas por BAL

Como foi mencionado no **Item 3.4.2**, as bacteriocinas produzidas por BAL possuem vários atrativos para serem utilizadas como bioconservantes. Contudo, são considerados microrganismos fastidiosos, pois necessitam da presença de muitos nutrientes para seu crescimento. Por isso, crescem em alimentos considerados ricos nutricionalmente, como leite, carnes e frutas. Esse fato pode ter relação com o tamanho de seu genoma que, ao ser comparado ao de outras bactérias, pode ser considerado pequeno, encontrando-se geralmente na faixa entre 2,0 e 3,4 Mb (megabase). Isso pode ter ocasionado uma diminuição da capacidade metabólica desses microrganismos e sua dependência da existência de nutrientes exógenos provenientes de meios ricos (Sauer *et al.*, 2017).

A dependência de um meio rico para o crescimento das BAL pode impactar no custo elevado da sua utilização em escala industrial para a produção de bacteriocinas e outros biocompostos (Sauer *et al.*, 2017). Dessa forma, novos meios de cultura utilizando resíduos industriais como o soro de leite e milhocina, os quais são ricas fontes de nutrientes, tornam-se promissores para obtenção das bacteriocinas de maneira menos custosa (Schueler, 2018). Isso é possível porque, mesmo havendo impurezas nos meios de cultura alternativos que venham de resíduos alimentares, o fato de todos possuírem origem alimentar faz com que sejam mais apropriados para a produção de bacteriocinas (Abbasiliasi *et al.*, 2017). A sua aplicação pode ser através da adição direta do sobrenadante livre de células (posbiótico) no mesmo tipo de alimentos, como citado no **Item 3.4.1**.

De forma geral, é preferível usar uma menor quantidade de conservantes nos alimentos para que haja menor possibilidade de alteração da textura e sabor (Carocho, Morales e Ferreira,

2015). Importante ressaltar que apesar das bacteriocinas não atribuírem sabor aos alimentos, quando são produzidas em meios alternativos a presença desses ou qualquer outro meio podem alterar as características organolépticas do produto final.

Existem alguns resíduos industriais que podem ser utilizados para o crescimento de BAL e a produção *ex situ* de bacteriocinas. Alguns desses incluem a milhocina, a água de maceração de milho, rica em nutrientes como nitrogênio (Schueler *et al.*, 2021). Além desse meio, existem outros resíduos industriais, como resíduo da soja, melão, licor de batata, resíduos de uva, farinha de peixe e o soro de leite (Bali, Panesar e Bera, 2016). O soro de leite é um resíduo da fabricação de queijo e cerca de 50% dele não é reaproveitado no Brasil e descartado indevidamente (Farinha, 2016). A reutilização dele já ocorre na fabricação de suplementos alimentares, bebidas lácteas, alimentação de animais, entre outros produtos. Devido à grande quantidade de proteínas presentes em sua composição, o soro de leite lançado no meio ambiente sem tratamento gera problemas ambientais, como eutrofização dos corpos d'água (Alves *et al.*, 2014; Kasmi, 2018).

A eutrofização é causada pela adição de nutrientes (como fósforo e nitrogênio) em um ambiente aquático, o que ocasiona o crescimento exacerbado de produtores primários, como fitoplâncton (que passam a impedir a passagem de luz e com isso, ocasionam a morte de plantas aquáticas). Dessa forma, tal crescimento gera um desequilíbrio no ecossistema, levando à anoxia do ambiente e, conseqüentemente, à morte dos organismos que necessitam de oxigênio. Este fato gera conseqüências como a restrição da pesca no local afetado e até mesmo em danos aos seres humanos pela atuação de cianotoxinas, produzidas por cianobactérias que podem crescer demasiadamente devido a eutrofização (Ferreira, Cunha-Santino e Júnior, 2015).

Embora esses impactos ocasionados pelo descarte de soro de leite no meio ambiente venham diminuindo nos últimos anos em países industrializados, muito provavelmente devido às leis ambientais, eles ainda representam um obstáculo a ser totalmente elucidado (Kasmi, 2018). Para atingir esse objetivo, pode-se utilizar três tipos de abordagens: (i) tratamento biotecnológico (sem valorização desse soro de leite), (ii) tratamento físico-químico ou (iii) tratamento biotecnológico com valorização e reaproveitamento do soro de leite. Dentre os tratamentos biotecnológicos possíveis de serem usados antes do descarte do resíduo industrial, encontra-se a possibilidade de produção de bacteriocinas usando o soro de leite (Prazeres, Carvalho e Rivas, 2013; Kasmi, 2018).

Esse tratamento do soro de leite pode significar às empresas que o produzem, mais um segmento para a venda e conseqüentemente, lucro. O soro de leite é uma matriz viável para esse

fim, pois é nutricionalmente rico para o crescimento de bactérias fastidiosas como as BAL, possuindo 55% dos nutrientes do leite (Alves *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm evidenciado a produção de bacteriocinas por estirpes cultivadas em soro, por exemplo, a produção da nisina em soro de leite filtrado e não-filtrado, onde o melhor desempenho de produção foi obtido no soro não-filtrado. Esse resultado foi relacionado com o fato de a filtração retirar a maior parte das proteínas insolúveis que teriam um papel importante para a produção da nisina (de Arauz *et al.*, 2009).

Apesar do soro de leite ser nutricionalmente rico, alguns nutrientes, como fontes de nitrogênio, podem ser adicionados para favorecer a produção de bacteriocinas por BAL. Ainda que a quantidade de nitrogênio presente no soro de leite possa ocasionar eutrofização em corpos d'água, ela pode ser considerada insuficiente para tratamentos biotecnológicos, como processos aeróbicos ou anaeróbicos. Sendo assim, o enriquecimento do soro de leite com fontes de nitrogênio pode ser adequado para seu melhor reaproveitamento para a produção de biocompostos (Prazeres, Carvalho e Riva, 2012; Carvalho, Prazeres e Riva, 2013).

Guerra e Pastrana (2001) testaram diferentes fontes de nitrogênio como suplementação do soro de leite, onde destacou-se o extrato de levedura como um suplemento estimulador da produção de bacteriocinas. Em escala industrial, a utilização de amônia ou seus sais apresentam um bom custo-benefício, que segundo Mondrágon-Parada e colaboradores (2006), podem ser utilizados em conjunto com nutrientes como o extrato de levedura e fosfato diamônico.

O soro de leite para a produção de bacteriocinas pode ser utilizado fresco, na forma líquida ou em pó produzido em *spray dryer*. Alguns estudos sugerem que o uso de soro de leite em pó é a melhor opção para a produção de bacteriocinas, pois a secagem por atomização do soro de leite transformando-o em pó permite a redução de custos logísticos (Alves *et al.*, 2014). Ademais, há menor carga microbiana presente no soro de leite em pó em comparação ao soro de leite fresco (Ananou *et al.*, 2008; Schueler, 2018). A secagem por atomização (ou *spray dryer*) pode ser utilizada no soro de leite gerado como resíduo pelas indústrias (**Figura 9**), para sua venda; ou ainda, para a produção em larga escala de um pó com estirpes produtoras de bacteriocinas para seu uso em alimentos (Silva *et al.*, 2002; Kasmi, 2018).

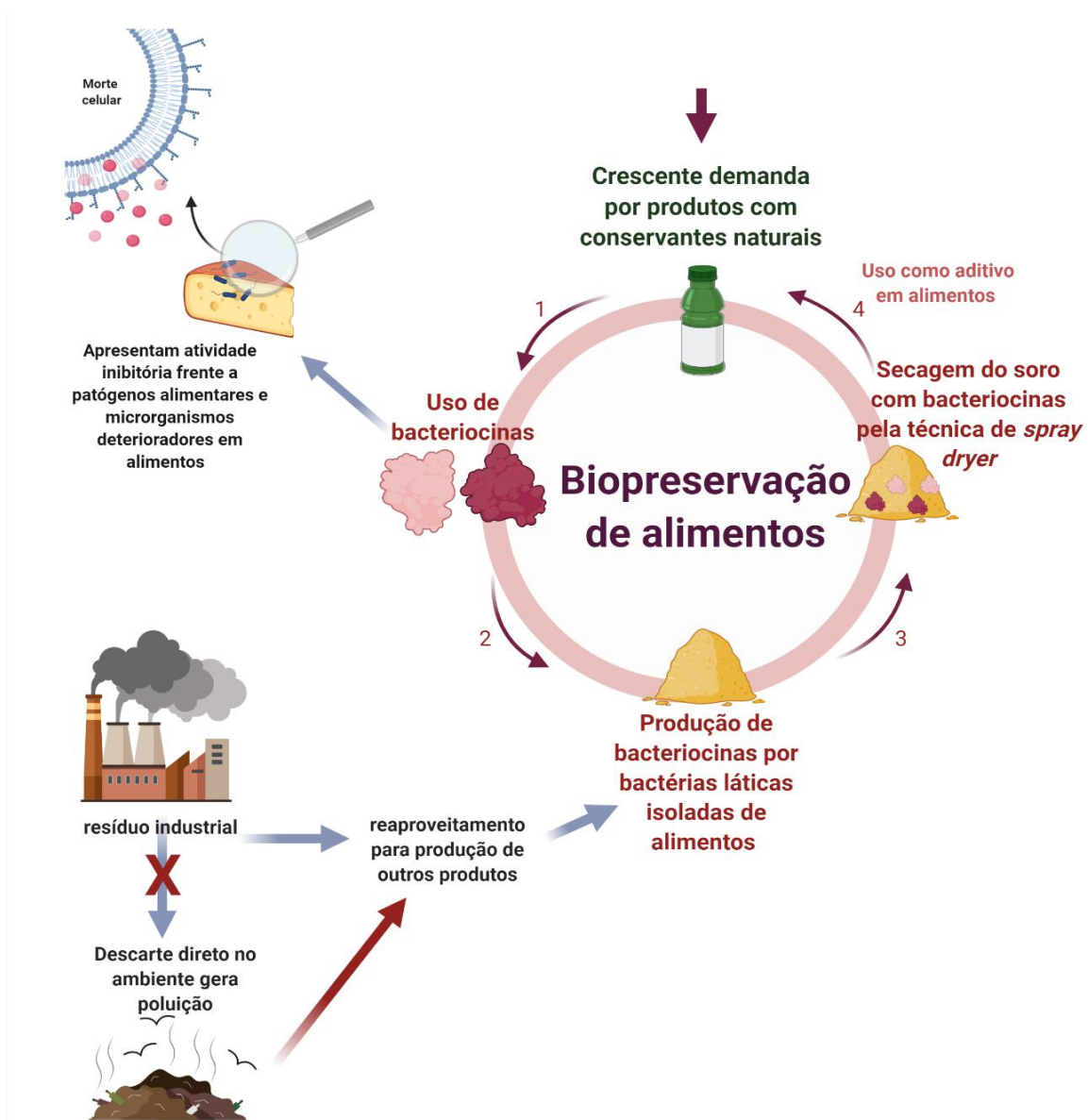


Figura 9. Esquema de reaproveitamento de resíduo industrial para a produção *ex situ* de bacteriocinas. A produção de bacteriocinas em um resíduo industrial pode auxiliar na redução de impactos ambientais. A secagem do produto final pode ser realizada para a redução de custos logísticos de armazenamento e transporte. Criado com BioRender.com.

A produção de um pó bioativo contendo bacteriocina, produzida por *L. lactis* DPC 3147, se mostrou promissora na redução de *L. monocytogenes* em leite infantil comercializado e na manutenção da atividade antimicrobiana após o processo de secagem por *spray dryer* (Morgan *et al.*, 1999).

Silva e colaboradores (2002) mostraram que o soro de leite cultivado com *Carnobacterium divergens* e tratado por *spray dryer* mostrou uma menor capacidade de inibição de *Staphylococcus aureus* do que o soro não-tratado. Entretanto, este resultado não foi observado no soro cultivado com *L. sakei* e *L. salivarius*. A atividade inibitória de *L. salivarius*

foi detectada durante três meses de estocagem do soro em pó. Estes resultados indicam que a redução de atividade antimicrobiana após o uso desse processo de secagem, depende da estirpe utilizada e da bacteriocina que é produzida pela estirpe.

Ananou e colaboradores (2010) buscaram produzir um pó (livre de células), contendo enterocina AS-48 que fosse capaz de atuar contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*, usando soro de leite como meio de cultura e a técnica de *spray dryer*. Os resultados encontrados demonstraram, que era possível a produção desse pó bioativo, apesar da dificuldade em eliminar as estirpes viáveis do mesmo. Além disso, a menor temperatura de armazenamento (-20 °C) era a melhor em termos de manutenção de sua atividade antimicrobiana. Apesar disso, em ambas as temperaturas de armazenamento (- 20 °C e 5 °C) houve atividade antimicrobiana detectada por até oito meses.

Musatti e colaboradores (2020) buscaram produzir a bacteriocina sakacina A, produzida por *Lactobacillus sakei* DSMZ 6333 em soro de leite, que contém reduzida quantidade de proteínas (conhecido como "whey permeate"). Esse meio foi adicionado de alguns componentes (extrato de carne, levedura, arginina, Tween-80 e um mix de vitaminas) e foi denominado meio de cultura para *L. sakei* (SAK). Tais componentes foram testados em diferentes quantidades para a produção em escala laboratorial. Também, foi usado o meio *de Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), para comparação e controle, e diferentes concentrações de inóculos. Os resultados indicaram que quanto maior o inóculo inicial, menor a fase lag e quando eram retirados o extrato de carne e de levedura do meio, a produção de bacteriocina era menor. Além disso, a comparação dos custos de produção entre o MRS e SAK, usando o custo de cada ingrediente desses meios (em escala laboratorial), mostra que o meio SAK seria menos custoso que o MRS.

Schueler e colaboradores (2021) indicaram que estirpes de *E. faecium* foram capazes de se multiplicar e de produzir bacteriocinas em um meio contendo milhocina. Essa produção teve uma eficiência sobre a estirpe sensível (*Listeria innocua* CLIP 12612) de forma semelhante ou até superior em comparação com a produção usando o meio controle MRS.

O uso de coprodutos ou subprodutos industriais para a produção de bacteriocinas é uma linha de pesquisa que vem crescendo nas últimas décadas e que pode levar a lucros pela indústria de alimentos. Isso porque pode agregar valor a um resíduo industrial e o conservante natural produzido pode ser vendido ou reutilizado na própria cadeia industrial. Por fim, ainda são necessários muitos estudos para entender a produção nesse tipo de meio de cultura e que otimizações do processo deverão ocorrer de forma personalizada, para cada estirpe bacteriocinogênica.

4. CONCLUSÕES

- Existe atualmente uma grande diversidade de métodos biológicos que podem ter o potencial de reduzir o emprego de conservantes químicos em alimentos;
- As bacteriocinas destacam-se entre os métodos de bioconservação de alimentos;
- As bacteriocinas de bactérias lácticas apresentam o maior potencial de aplicação entre as demais pela inocuidade da maioria das estirpes produtoras, espectro de ação amplo e histórico de uso experimental e comercial, sem associação de risco à saúde dos consumidores;
- As diferentes formas de utilização das bacteriocinas reforçam o seu potencial de utilização;
- Os fatores que afetam a produção das bacteriocinas são estirpe dependente e influenciados pelas condições de produção;
- Ainda que diversos métodos tenham sido propostos para a produção e obtenção destes compostos, existe ainda uma ampla área para a investigação de métodos de melhoramento desta tecnologia;
- A utilização de resíduos industriais, com o soro de leite é uma alternativa sustentável para a produção de bacteriocinas;
- A utilização da técnica de *spray dryer* associada à produção em soro de leite pode ser uma alternativa viável economicamente, além de reduzir custos logísticos de armazenamento e transporte;
- Estudos quanto à estabilidade das bacteriocinas após a utilização da técnica de *spray dryer* devem ser avaliados de forma a validar a possibilidade de produção por este método.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N. R., Mustafa, S., e Ariff, A. B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Royal society of Chemistry Advances*, 7(47), 29395-29420.
- Abdulummeen, H. A., Risikat, A. N., e Sururah, A. R. (2012). Food: Its preservatives, additives and applications. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 1, 36-47.
- Abee, T., Klaenhammer, T.R. e Letellier, L. (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 1006-1013.
- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., e Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 1-11.
- Altaf, U., Rouf, A., Kanojia, V., Ayaz, Q., e Zargar, I. (2018). Ultrasound treatment: A novel processing technique for food preservation. *The Pharma Innovation Journal*, 7 (2) 234-241
- Alves, M. P., de Oliveira Moreira, R., Júnior, P. H. R., de Freitas Martins, M. C., Perrone, Í. T., e de Carvalho, A. F. (2014). Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 69(3), 212-226.
- Amit, S. K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S. R., e Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture e Food Security*, 6(1), 51.
- Ananou, S., Muñoz, A., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. e Valdivia, E. (2008). Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. *International Dairy Journal*, 18(9), 923-927.
- Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M. e Valdivia, E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food microbiology*, 27(1), 58-63.
- ANVISA (2018) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia N° 16/ 2018 – Versão 1. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5056443/Guia+16_2018+prorrogacao+prazo.pdf/13a19f5f-94f8-4430-9548-6d43278ffb62#:~:text=O%20prazo%20de%20validade%20come%C3%A7a,259%2C%20de%202002.Acesso em 21/01/21.
- ANVISA (2020) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/alimentos/aditivosalimentares#:~:text=A%20RDC%20n.º%2011%20de%202018,2018%20de%202018. Acesso em 05/03/21.>
- Aoki, M., Ohtsuka, T., Yamada, M., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Yasuno, H., Sano, T., Watanabe, J., Yokose, K., e Seto, H. (1991). Cyclothiazomycin, a novel polythiazole-containing peptide with renin inhibitory activity. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical characterization. *Antibiotics*. 44, 582-588.
- Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi. K., e Saito, T. (2009). Effects of gasserins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. *Journal of dairy science*, 92(6), 2365-2372.
- Arnold, R. R., e Cole, M. F. (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, 197(4300), 263-265.
- Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., e Lindgren, S. E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial ecology in health and disease*, 2(2), 131-136.
- Bai, J., Kim, Y. T., Ryu, S., e Lee, J. H. (2016). Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. *Frontiers in microbiology*, 7, 474.
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A. e de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1), 134-142.
- Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., e Kennedy, J. F. (2016). Bacteriocins: recent trends and potential applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(5), 817-834.

- Bali, V., Panesar, P. S., e Bera, M. B. (2016). Trends in utilization of agro-industrial byproducts for production of bacteriocins and their biopreservative applications. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 204-214.
- Bastos, M.C.F., Coutinho, B.G. e Coelho, M.L.V. (2010). Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals* 3, 1139-1161.
- Beis, K., e Rebuffat, S. (2019). Multifaceted ABC transporters associated to microcin and bacteriocin export. *Research in microbiology*, 170(8), 399-406.
- Bharti, Vandana., Mehta, Archana., Singh, Siddharth., Jain, Neha., Ahirwal, Laxmi., e Mehta, Suchi; (2015). Bacteriocin: a novel approach for preservation of food. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 17(9), 20-29.
- Brasil (1969) Os Ministros da Marinha de Guerra, do Exército e da Aeronáutica militar fazem o Decreto-lei Nº 986, de 21 de outubro de 1969 que institui normas básicas sobre alimentos. Disponível em: <http://legislacao.planalto.gov.br/legisla/legislacao.nsf/VivIdentificacao/DEL%20986-1969?OpenDocument> Acesso em 21/12/2020.
- Brasil (1997a). Portaria nº 161, de 28 de abril de 1997. A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde aprova o uso do Sistema Lactoperoxidase com a função de coadjuvante de tecnologia. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1997/prt0161_28_04_1997.html. Acesso em 05/01/2021.
- Brasil (1997b). Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. O Ministério da Saúde publica o Regulamento técnico: aditivos alimentares, definições, classificação e emprego. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/portaria-no-540-de-27-de-outubro-de-1997.pdf/view>. Acesso em 05/01/2021.
- Brasil (2016a). Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>. Acesso em 10/01/21.
- Brasil (2016b). Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 123, de 04 de novembro de 2016. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/24497677/do1-2016-11-07-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-123-de-4-de-novembro-de-2016-24497531. Acesso em 05/01/2021.
- Brede, D.A., Faye, T., Johnsborg, O., Odegard, I., Nes, I.F. e Holo, H. (2004). Molecular and genetic characterization of propionin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*. *Applied. Environmental. Microbiology*. 70, 7303-7310.
- Brötz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E. e Sahl, H.-G. (1995). Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism? *Antimicrobial. Agents and Chemother.* 39, 714-719.
- Callewaert, L., e Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of biosciences*, 35(1), 127-160.
- Campana Filho, S. P., Signini, R., e Cardoso, M. B. (2007). Propriedades e aplicações de quitosana. *Revista Processos Químicos*, 1(2), 9-20.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., e Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 377-399.
- Carocho, M., Morales, P. e Ferreira, I. C. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in food science e technology*, 45(2), 284-295.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R. e Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the total environment*, 445, 385-396.
- Cavicchioli, V. Q., de Carvalho, O. V., de Paiva, J. C., Todorov, S. D., Júnior, A. S. e Nero, L. A. (2018). Inhibition of herpes simplex virus 1 (HSV-1) and poliovirus (PV-1) by bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Enterococcus durans* strains isolated from goat milk. *International journal of antimicrobial agents*, 51(1), 33-37.
- Chemat, F., e Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chen, H., e Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 82-100.

- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A. e Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology*, 49, 23-28.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., e Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.
- Coburn, P. S., e Gilmore, M. S. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular microbiology*, 5(10), 661-669.
- Coelho, M.L.V., Duarte, A.F.S., e Bastos, M.C.F. (2017). Bacterial labionin-containing peptides and sactibiotics: unusual types of antimicrobial peptides with potential use in clinical settings (a review). *Current. Topics in Medicinal. Chemistry*. 17, 1-22.
- Cooke, R. D., Twiddy, D. R., e Alan Reilly, P. J. (1987). Lactic-acid fermentations as a low-cost means of food preservation in tropicais countries. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 369-379.
- Cotter, P. D., Hill, C., e Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., e Hill, C. (2013). Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 95-105.
- Cvetković, D., Živković, V., Lukić, V., e Nikolić, S. (2019). Sodium nitrite food poisoning in one family. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 15(1), 102-105.
- da Silva Quintino, S., e Rodolpho, D. (2018). Um Estudo Sobre a Importância do APPCC-Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Indústria de Alimentos. *Revista Interface Tecnológica*, 15(2), 196-207.
- de Arauz, L. J., Jozala, A. F., Pinheiro, G. S., Mazzola, P. G., Júnior, A. P., e Vessoni Penna, T. C. (2008). Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. *Journal of Chemical Technology e Biotechnology: International Research in Process, Environmental e Clean Technology*, 83(3), 325-328.
- de Farias, F.M. (2016). Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos e estudo da efetividade de estafilococinas na biopreservação de queijo Minas Frescal com teor reduzido de sódio (Trabalho de conclusão de curso em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 92f.
- de Freire Bastos, M. D. C., Coelho, M. L. V., e da Silva Santos, O. C. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 161(4), 683-700.
- de Freire Bastos, M. D. C., de Farias, F. M., Fagundes, P. C., e Coelho, M. L. V. (2020). Staphylococins: an update on antimicrobial peptides produced by staphylococci and their diverse potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-30.
- de Melo Barros, D., da Silva, A. P. F., de Moura, D. F., Cavalcanti, I. D. L., da Silva, J. H. L., de França Leite, A. R., dos Santos, J. M. S., Melo, M.D.A., de Oliveira Costa, J., da Silva, G.M., de Oliveira, G.B., Rocha, T.A., da Costa, M.P., da Silva Padilha, C.B., de Oliveira Ferreira, S.A., e da Fonte, R. A. B. (2020). Principais Técnicas de Conservação dos Alimentos. *Brazilian Journal of Development*, 6(1), 806-821.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., e Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International dairy journal*, 16(9), 1058-1071.
- Desouky, O., Ding, N., e Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 247-254.
- dos Santos Ferreira, C., da Cunha-Santino, M. B. e Júnior, I. B. (2015). Eutrofização: aspectos conceituais, usos da água e diretrizes para a gestão ambiental. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 6(1), 65-77.
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., e Chikindas, M. L. (2016). Bacteriocins: not only antibacterial agents. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8(4), 177-182.
- Duan, C., Meng, X., Meng, J., Khan, M. I. H., Dai, L., Khan, A., An, X., Zhang, J., Huq, T e Ni, Y. (2019). Chitosan as a preservative for fruits and vegetables: a review on chemistry and antimicrobial properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 4(1), 11-21.
- Duarte, A.F.S. (2016). Caracterização genético-molecular da hycina 4244 e avaliação da sua potencial aplicação biotecnológica. (Tese Doutorado em Microbiologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 240f.
- Duran, A., e Kahve, H. I. (2017). The use of lactoferrin in food industry. *Academic Journal of Science*, 7, 89-94.

- Dutcher, J.D., e Vandeputte, J. (1955). Thiostrepton, a new antibiotic. II. Isolation and chemical characterization. *Antibiotics*. Annual 3, 560-561.
- Dwivedi, S., Prajapati, P., Vyas, N., Malviya, S., e Kharia, A. (2017). A review on food preservation: methods, harmful effects and better alternatives. *Asian J Pharmac Pharmacol*, 3(6), 193-199.
- Dykes, G. A. (1995). Bacteriocins: ecological and evolutionary significance. *Trends in ecology & evolution*, 10(5), 186-189.
- EFSA (2017a). European Food Safety Authority .The European Commission requests the European Food Safety Authority to provide a scientific opinion on the safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of the new toxicological data and on the proposed extension of use of nisin (E 234) to the categories 01.7.1 Unripened cheese excluding products falling in category 16 and 08.3.2 Heat-treated meat products in accordance with Regulation (EC) No 1331/2008 establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes and flavourings. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2017.5063>. Acesso em 01/04/2021.
- EFSA (2017b). European Food Safety Authority. EFSA explains risk assessment: nitrites and nitrates added to food. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/nitritesandnitrates170614>. Acesso em 23/02/2021.
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., e Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*, 7, 461.
- Eom, S. H., Kim, Y. M., e Kim, S. K. (2012). Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), 3251-3255.
- Ercan, S. e Soysal, Ç. (2013) Use of ultrasound in food preservation. *Natural Science*, 5, 5-13.
- FAO. (2003). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Assuring food safety and quality: Guidelines for strengthening national control. Paper 76. ISBN 0254-4725. Disponível em: <http://www.fao.org/3/y8705e/y8705e00.htm>. Acesso em 05/03/21.
- Farias, F. M (2018). Caracterização genética e molecular da BLIS (bacteriocin-like inhibitory substance) E86 produzida pela estirpe *Enterococcus faecium* E86 (Tese de Mestrado em Microbiologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, .98f.
- Farinha, L. R. L. (2016). Efeito da composição de bactérias lácticas e da suplementação do soro de leite na cinética de acidificação, crescimento celular e produção de nisina. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo,121 f.
- Farnaud, S., e Evans, R. W. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Journal of Molecular Immunology*, 40(7), 395-405.
- FDA (2013). Food and Drug Administration. GRAS Notice (GRN) N°. 669, Cow’s milk-derived lactoferrin. Disponível em: <https://fda.report/media/124473/GRAS-Notice-GRN-669-Part-2.pdf>. Acesso em 05/03/21.
- Férrir, G., Petrova, M.I., Andrei, G., Huskens, D., Hoorelbeke, B., Snoeck, R., Vanderleyden, J., Balzarini, J., Bartoschek, S., Brönstrup, M., Süßmuth, R.D. e Schols, D. (2013). The lantibiotic peptide labyrinthopeptin A1 demonstrates broad anti-HIV and anti-HSV activity with potential for microbicidal applications. *PLoS One* 8, e64010.
- Field, D., Ross, R. P., e Hill, C. (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, 20, 1-6.
- Francisco, MS (2019). Aureocina 4185 e aureociclicina 4185: um estudo sobre as bacteriocinas codificadas pelo genoma da estirpe *Staphylococcus aureus* 4185 (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 264f.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. e Ben-Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51-70.
- Ge, J., Kang, J., e Ping, W. (2019). Effect of acetic acid on bacteriocin production by gram-positive bacteria. *Journal of microbiology and biotechnology*, 29(9), 1341-1348.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., e Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International journal of antimicrobial agents*, 33(4), 301-e1- 301-e8.

- Guerra, N. P. e Pastrana, L. (2001). Enhanced nisin and pediocin production on whey supplemented with different nitrogen sources. *Biotechnology letters*, 23(8), 609-612.
- Gyawali, R., e Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429.
- Hammami, R., Fliss, I., e Corsetti, A. (2019). Application of protective cultures and bacteriocins for food biopreservation. *Frontiers in microbiology*, 10, 1561.
- Hammond, S. T., Brown, J. H., Burger, J. R., Flanagan, T. P., Fristoe, T. S., Mercado-Silva, N., Nekla, J. C e Okie, J. G. (2015). Food spoilage, storage, and transport: Implications for a sustainable future. *BioScience*, 65(8), 758-768.
- Hasan, M. N., Sultan, M. Z., e Mar-E-Um, M. (2014). Significance of fermented food in nutrition and food science. *Journal of Scientific Research*, 6(2), 373-386.
- Holo, H., Nilssen, Ø. e Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *Journal of Bacteriology*.173, 3879-3887.
- Hu, Z., e Gänzle, M. G. (2019). Challenges and opportunities related to the use of chitosan as a food preservative. *Journal of applied microbiology*, 126(5), 1318-1331.
- Ibarra-Sánchez, L. A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M. J., e Karam, L. (2020). Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *Journal of dairy science*, 103(3), 2041-2052.
- Ibrahim, O. (2020). Thermal and nonthermal food processing technologies for food preservation and their effects on food chemistry and nutritional values. *EC Nutrition*, 15(7), 88-105.
- Jan, A., Sood, M., Sofi, S. A., e Norzom, T. (2017). Non-thermal processing in food applications: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2(6), 171-180.
- Johnson, E. M., Jung, D. Y. G., Jin, D. Y. Y., Jayabalan, D. R., Yang, D. S. H., e Suh, J. W. (2018). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(16), 2743-2767.
- Joshua Ajibola, O. (2020). An overview of irradiation as a food preservation technique. *Novel Research in Microbiology Journal*, 4(3), 779-789.
- Kasmi, M. (2018). Biological processes as promoting way for both treatment and valorization of dairy industry effluents. *Waste and biomass valorization*, 9(2), 195-209.
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., e Saito, T. (2004). The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Current. Protein Peptide. Science*. 5, 393-398.
- Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P. e Vederas, J.C. (2003). Structure of subtilosin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to α -carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4726-4727.
- King, T., Cole, M., Farber, J. M., Eisenbrand, G., Zabarar, D., Fox, E. M., e Hill, J. P. (2017). Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 160-175.
- Kumari, P. K., Akhila, S., Rao, Y. S., e Devi, B. R. (2019). Alternative to Artificial Preservatives. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 10(1s), 99-102.
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., e Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis*, 128, 171-177.
- Kussendrager, K. D., e Van Hooijdonk, A. C. M. (2000). Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 19-25.
- Langa, S., Landete, J. M., Martín-Cabrejas, I., Rodríguez, E., Arqués, J. L., e Medina, M. (2013). In situ reuterin production by *Lactobacillus reuteri* in dairy products. *Food Control*, 33(1), 200-206.
- Lee, H., Churey, J.J., e Worobo, R.W. (2009). Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *FEMS Microbiol. Lett.* 299, 205-213.
- Leonardi, J. G., e Azevedo, B. M. (2018). Métodos de conservação de alimentos. *Revista Saúde em Foco*, 10(1), 51-61.

- Li, Y. X., Wijesekara, I., Li, Y., e Kim, S. K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46(12), 2219-2224.
- Liesch, J.M., McMillan, J.A., Pandey, R.C., Paul, I.C., Rinehart, K.L.J., e Reusser, F. (1976). Letter: Berninamycin. I. The structure of berninamycinic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 98, 299-300.
- Liu, C., Hofstra, N., e Franz, E. (2013). Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella spp.* *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 119-128.
- Lopes, N. A., e Brandelli, A. (2018). Nanostructures for delivery of natural antimicrobials in food. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(13), 2202-2212.
- López, M., Calvo, T., Prieto, M., Múgica-Vidal, R., Muro-Fraguas, I., Alba-Elías, F., e Alvarez-Ordóñez, A. (2019). A review on non-thermal atmospheric plasma for food preservation: Mode of action, determinants of effectiveness, and applications. *Frontiers in microbiology*, 10, 622.
- López-Cuellar, M. D. R., Rodríguez-Hernández, A. I., e Chavarría-Hernández, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1039-1050.
- Mani, A. (2018). Food Preservation by Fermentation and Fermented food products. *International Journal of Academic Research e Development*, 1, 51-57.
- Maqueda, M., Gálvez, A., Bueno, M.M., Sanchez-Barrena, M.J., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., e Valdivia, E. (2004). Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein & Peptide Science*, 5, 399-416.
- Marchewka, D., Roterman, I., Strus, M., Śpiwak, K., e Majka, G. (2012). Structural analysis of the lactoferrin iron binding pockets. *Bio-Algorithms and Med-Systems*, 8(4), 351-359.
- Martin, N.I., Sprules, T., Carpenter, M.R., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. e Vederas, J.C. (2004). Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry* 43, 3049--3056.
- Martín-Escolano, R., Cebrián, R., Martín-Escolano, J., Rosales, M. J., Maqueda, M., Sánchez-Moreno, M., e Marín, C. (2019). Insights into Chagas treatment based on the potential of bacteriocin AS-48. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10, 1-8.
- Masschalck, B., e Michiels, C. W. (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 29(3), 191-214.
- Masson, P. L., Heremans, J. F., e Dive, C. H. (1966). An iron-binding protein common to many external secretions. *Clinica Chimica Acta*, 14(6), 735-739.
- Mattick, A.T.R., Hirsch, A. e Berridge, N.J. (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *The Lancet* 2, 5-7.
- Miguel, M. A. L., De Castro, Â. C. D e Leite, S. F. G. (2008). Inhibition of vancomycin and high-level aminoglycoside-resistant enterococci strains and *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* E86. *Current microbiology*, 57(5), 429-436.
- Mills, S., Ross, R. P., e Hill, C. (2017). Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp_1), S129-S153.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., e Ross, R. P. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 299-329.
- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., e Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 3(3-4), 159-170.
- Molino, S., Casanova, N. A., Rufián Henares, J. A., e Fernandez Miyakawa, M. E. (2019). Natural tannin wood extracts as a potential food ingredient in the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 2836-2848.
- Mondragón-Parada, M. E., Nájera-Martínez, M., Juárez-Ramírez, C., Galíndez-Mayer, J., Ruiz-Ordaz, N. e Cristiani-Urbina, E. (2006). Lactic acid bacteria production from whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(3), 223-232.

- Montalban-Lopez, M., Sanchez-Hidalgo, M., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M., e Maqueda, M. (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(8), 1205-1220.
- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yılmaz, N., e Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3390-3415.
- Morgan, S. M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R. P. e Hill, C. (1999). Development of a Lacticin 3147–Enriched Whey Powder with Inhibitory Activity against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1011-1016.
- Musatti, A., Cavicchioli, D., Mapelli, C., Bertoni, D., Hogenboom, J. A., Pellegrino, L., e Rollini, M. (2020). From Cheese Whey Permeate to Sakacin A: a circular economy approach for the food-grade biotechnological production of an anti-*Listeria* bacteriocin. *Biomolecules*, 10(4), 597.
- Negash, A. W., e Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 7.
- Netz, D.J.A., Bastos, M.C.F. e Sahl, H.-G. (2002). Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Applied. Environmental. Microbiology*. 68, 5274-5280.
- Netz, D.J.A., Sahl, H.-G., Marcolino, R., Nascimento, J.S., Oliveira, S.S., Soares, M.B. e Bastos, M.C.F. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Molecular. Biology*. 311, 939-949.
- Oliveira A.G.G (2013). Expressão de antagonismo por *Parabacteroides distasonis*: pesquisa, purificação e caracterização de substâncias tipo bacteriocinas. (Dissertação de mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 127 f.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., e Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 50(3), 512-542.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., e Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922-935.
- Pizzi, A. (2019). Tannins: Prospectives and actual industrial applications. *Biomolecules*, 9(8), 344.
- Prange, T., Ducruix, A., Pascard, C., e Lunel, J. (1977). Structure of nosiheptide, a polythiazole-containing antibiotic. *Nature* 265, 189-190.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F. e Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of environmental management*, 110, 48-68.
- Quereda, J. J., Meza-Torres, J., Cossart, P., e Pizarro-Cerdá, J. (2017). Listeriolysin S: a bacteriocin from epidemic *Listeria monocytogenes* strains that targets the gut microbiota. *Gut Microbes*, 8(4), 384-391.
- Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-Silleras, B., e Redondo-Del-Río, M. P. (2019). Food safety through natural antimicrobials. *Journal of Antibiotics*, 8(4), 208.
- Rameshkumar, N., Govindarajan, R. K., Krishnan, M. e Kayalvizhi, N. (2016). Scope of Bacteriocins as a Viable Alternative to the Traditional Antibiotics. *Advances in Plants Agriculture. Research*, 5, 1-3.
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47-56.
- Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittal, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P., e Hill, C. (2010). Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 9352-9357.
- Rodríguez, J.M., Martínez, M.I. e Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical. Reviews. Food Science. Nutrition* .42, 91-121.
- Roman, S., Sánchez-Siles, L. M., e Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in food science & technology*, 67, 44-57.
- Ross, R. P., Morgan, S., e Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), 3-16.

- Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. H. e Marx, H. (2017). The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. *Trends in biotechnology*, 35(8).
- Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., e Britton, R. A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*, 156(6), 1589-1599.
- Schueler, J. (2018). Produção de enterocina em soro de leite parcialmente desmineralizado e água de maceração de milho (tese de mestrado) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná,.43 f.
- Schueler, J., de Souza, C. M., Katsuda, M. S., Furlaneto, M. C., e Furlaneto-Maia, L. (2021). Milhocina como fonte proteica para produção de bacteriocina por *Enterococcus faecium*. *Research, Society and Development*, 10(2).
- Seifu, E., Buys, E. M., e Donkin, E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16(4), 137-154.
- Selva, E., Beretta, G., Montanini, N., Saddler, G.S., Gastaldo, L., Ferrari, P., Lorenzetti, R., Landini, P., Ripamonti, F., Goldstein, B.P., Berti, M., Montanaro, L., e Denaro, M. (1991). Antibiotic GE2270 a: a novel inhibitor of bacterial protein synthesis. I. Isolation and characterization. *Journal. of Antibiotic*. 44, 693-701.
- Shannon, E., e Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14(4), 81.
- Sharif, Z. I. M., Mustapha, F. A., Jai, J., Yusof, N. M., e Zaki, N. A. M. (2017). Review on methods for preservation and natural preservatives for extending the food longevity. *Chemical Engineering Research Bulletin*, 145-153.
- Sharma, S. (2015). Food Preservatives and their harmful effects. *International journal of scientific and research publications*, 5(4), 1-2.
- Shen, H. S., Shao, S., Chen, J. C., e Zhou, T. (2017). Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 316-329.
- Shoji, J., Hinoo, H., Wakisaka, Y., Koizumi, K., e Mayama, M. (1976). Isolation of three new antibiotics, thiocillins I, II and III, related to micrococcin P. Studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. VIII. *Journal of Antibiotics*. 29, 366-374.
- Sidooski, T., Brandelli, A., Bertoli, S. L., Souza, C. K. D., e Carvalho, L. F. D. (2019). Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria—A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(17), 2839-2849.
- Silva, A., Silva, S. A., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Gullón, P., Fraga-Corral. M; Domingues. V.F; Barroso Fátima. M; Simal-Gandara.J; e Prieto, M. A. (2020a). Antibacterial Use of Macroalgae Compounds against Foodborne Pathogens. *Antibiotics*, 9(10), 712.
- Silva, C. C., Silva, S. P., e Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594.
- Silva, E., Oliveira, J., Silva, Y., Urbano, S., Sales, D., Moraes, E., Rangel, A., Anaya, K. (2020b). Lactoperoxidase system in the dairy industry: Challenges and opportunities. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(6), 337-346.
- Silva, J., Carvalho, A. S., Teixeira, P. e Gibbs, P. A. (2002). Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), 77-81.
- Simons, A., Alhanout, K., e Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639.
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open veterinary journal*, 8(1), 104-111.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS microbiology reviews*, 45(1), fuaa03.
- Stavropoulou, E., e Bezirtzoglou, E. (2019). Predictive modeling of microbial behavior in food. *Foods*, 8(12), 654.

- Szymkowiak, A., Guzik, P., Kulawik, P., e Zając, M. (2020). Attitude-behaviour dissonance regarding the importance of food preservation for customers. *Food Quality and Preference*, 84, 103935.
- Thompson, J.K., Collins, M.A. e Mercer, W.D. (1996). Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ450. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 338-348.
- Tian, B., e Liu, Y. (2020). Chitosan-based biomaterials: From discovery to food application. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(11), 2408-2421.
- Todorov, S. D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic Organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Brazilian journal of microbiology*, 40(2), 209-221.
- Tumbariski, Y., Yanakieva, V., Nikolova, R., Mineva, G., Deseva, I. e Mihaylova, D. (2019). Antifungal effect of a bacteriocina of *Bacillus Methylophilicus* BM47 and its potential application as a biopreservative in traditional bulgarian yogurt. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2019, 659-662.
- Umar Lule, S., e Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: a review. *Food Reviews International*, 21(4), 367-388.
- Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., e Venkitanarayanan, K. (2014). Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. *BioMed research international*, 2014.ID 761741,18p.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., e Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, 16(11), 1241-1251.
- Weitzberg, E., e Lundberg, J. O. (2013). Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annual review of nutrition*, 33, 129-159.
- WHO (2006). World Health Organization. Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation: report of an FAO/WHO technical meeting, FAO Headquarters, Rome, Italy, 28 November-2 December 2005. In *Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation: report of an FAO/WHO technical meeting, FAO Headquarters, Rome, Italy, 28 November-2 December 2005*. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43553>. Acesso dia 22/01/21.
- WHO (2020). World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso dia 22/12/2020.
- Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M., e Noskova, S. (2020). Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics*, 9(9), 553.