



Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas:
classificação, pesquisa e aplicações, com
foco nos gêneros *Bacillus* e
Staphylococcus

João Paulo Ustritto Pontes

Monografia em Engenharia de Bioprocessos

Orientadoras

Prof^a Karen Signori Pereira, D.Sc.

Prof^a Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc

Maio de 2012

BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS GRAM-
POSITIVAS: CLASSIFICAÇÃO, PESQUISA E
APLICAÇÕES, COM FOCO NOS GÊNEROS
Bacillus E *Staphylococcus*

João Paulo Ustritto Pontes

Monografia em Engenharia de Bioprocessos submetida ao corpo docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

Eliana Flávia Campoprese. Sérvulo , D.sc.

Bernardo Dias Ribeiro, D.Sc.

Elisabete Barbosa de Paula Barros , D.Sc

Orientado por:

ProfªKaren Signori Pereira, D.Sc.

ProfªMelissa L. E. Gutarra, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Maio de 2012

Pontes, João Paulo Ustritto

Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas: classificação, pesquisa e aplicações, com foco nos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* / João Paulo Ustritto Pontes / Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2012. xiii, 63 p.; il.

Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas: classificação, pesquisa e aplicações, com foco nos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2012. Orientadores: Karen Signori Pereira e Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

1. Bacteriocinas. 2. *Bacillus*. 3. *Staphylococcus*. 4. Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas: classificação, pesquisa e aplicações, com foco nos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* (Graduação –UFRJ/EQ). 5. Flávia Karen Signori Pereira, D.Sc. 6. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.

***Aos meus pais. Este
trabalho e tudo o que ele
representa é mais de vocês do
que meu.***

***“[...]E hoje estou de volta à vida
Aos amigos, aos sorrisos sob o Sol
E hoje estou de volta à vida
Pra você esta é a canção da despedida.”
Canção da Despedida – Heróis da Resistência
É o que eu tenho a dizer para a Eq...***

***“[...] E nossa história, não estará
Pelo avesso assim, sem final feliz.
Teremos coisas bonitas pra contar.[...]”***

***Metal Contra as Nuvens – Legião Urbana
(Renato Russo)***

Agradecimentos

Primeiramente, aos meus pais, Marilda e Frederico, e a minha irmã, Maria Clara. Este trabalho e tudo o que ele representa é para vocês e por vocês. Obrigado a todos por tudo.

Aos meus familiares, próximos e distantes.

À minha namorada, Renata, por todo o apoio, carinho, amor e paciência.

Aos meus amigos, próximos e distantes, novos e antigos. Todos vocês foram importantes em algum momento dessa longa jornada de oito anos. Há muitos que merecem menção e, por temor de deixar alguém de fora, não os listarei todos. Já os agradei pessoalmente e, se não o fiz até o momento de lerem estas linhas, foi apenas por falta de oportunidade.

À Escola de Química, pelos anos que me serviu de casa.

Às orientadoras Karen Signori Pereira e Melissa L. E. Gutarra, pelos conselhos e sugestões e, por que não, pela paciência.

Aos meus professores, em especial a Rossana Folly, por todas as reprovações em Modelagem (sem sarcasmos, elas foram fundamentais); Fred (termo).

Um obrigado especialíssimo à Professora Ana Lúcia do Amaral Vendramini, por permitir que eu estudasse e trabalhasse sem empecilhos. Eu não poderia ter completado este curso sem a sua ajuda.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, um muito obrigado. Infelizmente, o espaço é por demais curto para nomeá-los todos.

Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

**BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS:
CLASSIFICAÇÃO, PESQUISA E APLICAÇÕES, COM FOCO NOS
GÊNEROS *BACILLUS* E *STAPHYLOCOCCUS***

João Paulo Ustritto Pontes

Mai de 2012

Orientadoras: Prof^a Karen Signori Pereira, D.Sc.

Prof^a Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc

Bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas excretados por bactérias e que apresentam atividade contra outras bactérias, em geral, relacionadas evolutivamente com o organismo produtor. Formam um grupo bastante heterogêneo, variando quanto ao espectro de ação, modo de ação, massa molar e propriedades bioquímicas. As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas mais conhecidas são aquelas produzidas por bactérias lácticas (BAL), dentre as quais são mais conhecidas aquelas chamadas de antibióticos. Lantibióticos são substâncias antimicrobianas, bacteriocinas, e se caracterizam pela presença de aminoácidos modificados, em particular, os aminoácidos tio-éter lantionina e metil-lantionina, ambos produzidos por complexos multienzimáticos. A classificação mais utilizada no estudo das bacteriocinas é aquela baseada nas características observadas na bacteriocinas produzidas por BAL. Dentre os gêneros de bactérias Gram-positivas produtoras de bacteriocinas podemos destacar o gênero *Staphylococcus* devido à sua importância na indústria de alimentos e o gênero *Bacillus*, cujas bacteriocinas com características singulares levou a uma nova proposta de classificação específica. O estudo de bacteriocinas tem despertado grande interesse devido ao aumento da resistência bacteriana a antibióticos de amplo espectro e a possibilidade de utilização das mesmas como biopreservativo de alimentos.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO:	1
2) OBJETIVOS:	2
2.1) <i>OBJETIVO GERAL</i> :	2
2.2) <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> :	2
3) ASPECTOS HISTÓRICOS:	3
4) DEFINIÇÃO:	4
5) CARACTERÍSTICAS DAS BACTERIOCINAS:	5
5.1) <i>ESPECTRO DE INIBIÇÃO E RECEPTORES</i> :	6
5.2) <i>ESTRUTURA E SÍNTESE</i> :	8
5.3) <i>MECANISMOS DE AÇÃO</i> :	8
5.4) <i>BIOSSÍNTESE LETAL</i> :	9
6) CLASSIFICAÇÃO BASEADA EM BAL:	10
6.1) <i>CLASSE I OU LANTIBIÓTICOS</i> :	11
6.1.1) <i>TIPO A</i> :	13
6.1.2) <i>TIPO B</i> :	14
6.1.3) <i>TIPO C</i> :	15
6.1.4) <i>TIPO D</i> :	16
6.2) <i>CLASSE II</i> :	16

6.2.1) <i>SUBCLASSE IIA:</i>	17
6.2.2) <i>SUBCLASSE IIB:</i>	17
6.2.3) <i>SUBCLASSE IIC:</i>	18
6.2.4) <i>SUBCLASSE IID:</i>	18
6.2.5) <i>SUBCLASSE IIE:</i>	19
6.3) <i>CLASSE III:</i>	19
6.3.1) <i>SUBCLASSE IIIA:</i>	20
6.3.2) <i>SUBCLASSE IIIB:</i>	20
7) ESTAFILOCOCCINAS	22
7.1) <i>ESTAFILOCOCCINAS PRODUZIDAS POR SCN:</i>	24
7.2) <i>ESTAFILOCOCCINAS PRODUZIDAS POR SCP:</i>	26
8) BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACILLUS:	27
8.1) <i>CLASSIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR BACILLUS:</i>	28
8.1.1.1) <i>SUBCLASSE I.1:</i>	29
8.1.1.2) <i>SUBCLASSE I.2:</i>	30
8.1.1.3) <i>SUBCLASSE I.3:</i>	31
8.1.1.4) <i>SUBCLASSE I.4:</i>	32
8.1.2) <i>CLASSE II:</i>	32
8.1.2.1) <i>SUBCLASSE II.1:</i>	33

8.1.2.2) <i>SUBCLASSE II.2:</i>	34
8.1.2.3) <i>SUBCLASSE II.3:</i>	35
8.1.3) <i>CLASSE III:</i>	35
8.2) <i>BLIS PRODUZIDAS POR BACILLUS:</i>	37
9) IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS:	38
10) APLICAÇÕES:	46
10.1) <i>APLICAÇÕES EM MEDICINA:</i>	46
10.2) <i>APLICAÇÕES COMO BIOPRESERVATIVOS DE ALIMENTOS:</i>	47
11) CONSIDERAÇÕES FINAIS:	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	55
ANEXO:	62

ÍNDICE DE QUADROS:

Quadro 1: Exemplos de organismos sensíveis à Nisina	7
Quadro 2: Classificação baseada em BAL	21
Quadro 3: Bacteriocinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp.	26
Quadro 4: Classificação proposta para bacteriocinas de <i>Bacillus</i> e comparação com BAL	35
Quadro 5 – Bacteriocinas e potenciais aplicações em tratamento de infecções:	47

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Ilustração de alguns modos de ação de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.	12
Figura 2: Estrutura do lantibiótico Nisina A (Subtipo AI).	13
Figura 3:: Estruturas dos lantibióticos Mersacidina (Tipo B) e Cinamicina (Tipo B).....	15
Figura 4: Estrutura do lantibiótico Tipo C lacticina 3147	16
Figura 5: Estrutura dos lantibióticos Epidermina (A), Galidermina (B), Pep5 (C) e Epilancina K7 (D)	25
Figura 6: Comparação entre as estruturas da Nisina (Nisin), Subtilina (subtilin), Ericina S (Ericin S) e Ericina A (Ericin A).....	30
Figura 7: Ilustração das estruturas de quatro bacteriocinas.	33
Figura 8: Exemplo de ensaio para seleção de microrganismo.	40
Figura 9: Exemplo de uma curva de produção de bacteriocina e crescimento bacteriano.	42
Figura 10: Cinética de ação da SAM 4244 contra estirpe indicadora L monocytogenes ATC19117.....	44

Nomenclatura

BAL: Bactérias Lácticas

BLIS : *bacteriocin-like inhibitory substances* (Substância Inibidora do tipo bacteriocina)

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, em inglês)

D.O.: Densidade Óptica

Da: Dalton

EDTA : ácido etilenodiamino tetra-acético

g: grama

GRAS: Generally Regarded as Safe (Geralmente consideradas seguras)

h: hora

kDa: quilo Dalton

kg: quilograma

L: Litro

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

OAA: Organização de Alimentos e Agricultura

°C: Celsius

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

SCN: *Staphylococcus* catalase-negativa

SCP: *Staphylococcus* catalase-positiva

UFC/ml: Unidade Formadora de colônia por mililitro

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UV: ultra violeta

1) INTRODUÇÃO:

Bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas excretados por bactérias e que apresentam atividade contra outras bactérias, em geral, relacionadas evolutivamente com o organismo produtor. Formam um grupo bastante heterogêneo, variando quanto ao espectro de ação, modo de ação, massa molar e propriedades bioquímicas.

Bactérias Gram-positivas, majoritariamente, produzem bacteriocinas de tamanho inferior a 6 kDa, sendo aquelas produzidas por bactérias lácticas as mais conhecidas e estudadas e, por este motivo, servem de base para o principal esquema de classificação das bacteriocinas. As mais conhecidas entre as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são aquelas denominadas Lantibióticos.

Lantibióticos são substâncias antimicrobianas, bacteriocinas, e se caracterizam pela presença de aminoácidos modificados, em particular, os aminoácidos tio-éter lantionina e metil-lantionina, ambos produzidos por complexos multienzimáticos.

Em 1947, foi descoberta a Nisina, uma bacteriocina produzida por várias estirpes de *Lactococcus lactis* e que viria a se tornar a primeira bacteriocina liberada para utilização na preservação de alimentos. Desde então, há a busca por novas bacteriocinas que possam ser utilizadas com o mesmo fim. Isso se dá pois tais substâncias são relativamente estáveis, são ativas em baixas concentrações, além de muitas das estirpes produtoras serem consideradas como “geralmente seguras” ou, do inglês, *Generally Regarded as Safe* (GRAS).

Essa busca não tem se limitado apenas à indústria de alimentos, outrossim há estudos que têm por objetivo encontrar bacteriocinas com potencial utilização terapêutica, tanto para tratamentos clínicos em humanos quanto em casos veterinários. Contribuem para isto a especificidade de ação dessas substâncias e a cada vez maior preocupação com o desenvolvimento de resistência aos antibióticos conhecidos por parte de diversos microrganismos.

Todo este potencial e grande campo de aplicações justifica a produção de um trabalho de revisão que procure expor as principais definições, classificações, métodos de pesquisa e potenciais aplicações de modo a incentivar trabalhos de graduação e pós-graduação na Escola de Química.

2) Objetivos:

2.1) OBJETIVO GERAL:

- Esta monografia pretende revisar os principais tópicos relacionados às bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, em especial aquelas produzidas pelos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus* e abordá-los de maneira didática, de modo que o texto aqui apresentado possa ser utilizado como uma primeira referência para futuros alunos de graduação e pós-graduação que desejem iniciar os estudos no campo das bacteriocinas.

2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Apresentar aspectos históricos das bacteriocinas, bem como uma definição clara dessas substâncias, as classificações mais utilizadas e as novas propostas de classificação de bacteriocinas;
- Apresentar aspectos metodológicos do processo de pesquisa, abordando a detecção, caracterização, isolamento e purificação das bacteriocinas, bem como aspectos mercadológicos e aplicações;

3) ASPECTOS HISTÓRICOS:

No final do século XIX, Pasteur e Joubert reportaram, pela primeira vez, a interação antagônica entre bactérias. Observaram que uma “bactéria ordinária” (provavelmente *Escherichia coli*) era capaz de interferir no crescimento de bacilli causadores de antraz. Esses pesquisadores observaram tal fenômeno tanto em culturas, usando urina como meio de cultivo, quanto em animais infectados experimentalmente (HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

Como havia maior interesse nas implicações biológicas de tais interações antagônicas, do que na caracterização química das moléculas envolvidas, muitos estudos concentraram-se na possibilidade de se utilizar tais interações no controle de doenças, tais como carbúnculo hemático e difteria. Ainda que a natureza química das substâncias químicas não tenha sido estudada, parece provável que muitas fossem bacteriocinas (JACK e TAGG, 1995).

Foi Gratia (1925) o primeiro a registrar a natureza de um agente antimicrobiano produzido por *E. coli* durante um estudo sobre mecanismos de inibição entre microrganismos. Ficou demonstrado que *E. coli*, estirpe virulenta em infecções experimentais, produz, em meio líquido, uma substância termoestável e dializável capaz de interferir e inibir o crescimento de outras estirpes de *E. coli*. Esta substância foi denominada colicina e sua natureza proteica foi determinada por Gratia e Frederiq (1946) (CASCALES, BUCHANAN, et al, 2007).

Colicinas são proteínas sintetizadas por algumas estirpes de *Escherichia coli*. Possuem efeito bactericida contra outras estirpes de *E. coli*, sendo estas, em geral, relacionadas evolutivamente com a estirpe produtora. Desde que foi descoberta muitas outras proteínas provenientes de bactérias entéricas (*E.coli*, *Shigella* e *Citrobacter*) com o mesmo tipo de atividade foram caracterizadas. Colicina tornou-se o nome de um grupo de proteínas e não apenas de um peptídeo específico (RILEY, 2002).

Colicinas estão presentes em aproximadamente 30% de todos os isolados de *E. coli* e, acredita-se, estão envolvidas no processo competitivo entre estirpes evolutivamente relacionadas durante períodos críticos, como os causados por falta de nutrientes no meio e exposição a outras condições adversas (LANCASTER e WINTERMEYER, 2007). São historicamente importantes no estudo das bacteriocinas não apenas por terem sido as primeiras a serem descritas, mas, também, por terem sido as mais estudadas e serem as únicas, juntamente com outras bacteriocinas

entéricas, como as klebicinas, sobre as quais estudos evolucionários detalhados foram realizados(RILEY, 1998).

A primeira descrição de antagonismo entre duas bactérias Gram-positivas foi de Babes (1885), quando observou a inibição de *Staphylococcus* spp. por outro *Staphylococcus* spp. Estudos posteriores sugeriram que bactérias do gênero *Staphylococcus* são capazes de inibir *Corynebacterium diphtheriae*, descoberta que levou à utilização de *Staphylococcus* spp. em *sprays* orais e nasais no tratamento de difteria (JACK e TAGG, 1995).

Reconhecendo que substâncias antimicrobianas do tipo colicina podem ser produzidas não apenas por coliformes, mas, também, por outras bactérias Gram-negativas e por Gram-positivas, Jacob et al.(1953) criaram o termo Bacteriocina. Este termo que, à época, definia especificamente uma substância peptídica do tipo colicina, com a descoberta de novas bacteriocinas, passou a ser utilizado de forma mais geral (CASCALES, BUCHANAN, *et al.*, 2007; HENG, WESCOMBE, *et al.*, 2007; JACK e TAGG, 1995).

4) DEFINIÇÃO:

Define-se bacteriocinas como peptídeos com atividade antimicrobiana, sintetizados por via ribossômica, capazes de inativar ou inibir o crescimento de outras bactérias relacionadas evolutivamente às estirpes produtoras (ROGNE, HAUGEN, *et al.*, 2009; DUARTE, 2010; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Bacteriocinas são produzidas tanto por bactérias Gram-negativas quanto por Gram-positivas. Dentre as produzidas por Gram-negativas, aquelas produzidas por *E. coli*, as colicinas, estão entre as mais conhecidas, servindo como modelos de estudo de modos de ação e evolução (RILEY, 1998; RILEY, 2002).

Assim como bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas também produzem bacteriocinas e os estudos iniciais basearam-se naquelas produzidas por estafilococos. Para tanto, tentou-se, inicialmente, aplicar-se os mesmos princípios de classificação utilizados para as colicinas. Entretanto, rapidamente percebeu-se que poucas poderiam ser bem descritas com tais parâmetros (HENG, WESCOMBE, *et al.*, 2007).

As bacteriocinas de bactérias Gram-positivas mais estudadas são aquelas provenientes de bactérias ácido-lácticas (BAL), pois muitas estirpes apresentam alto potencial de uso como biopreservativos na indústria de alimentos por serem *Generally*

Recognized as Safe (GRAS), ou seja, geralmente reconhecidas como seguras (O'SULLIVAN e ROSS, 2002; DUARTE, 2010).

Outro grupo muito estudado de bacteriocinas é aquele produzido por algumas espécies do gênero *Bacillus*, pois também apresentam potencial industrial (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

5) CARACTERÍSTICAS DAS BACTERIOCINAS:

É importante ressaltar que bacteriocinas não são os únicos agentes antimicrobianos utilizados por bactérias. Muitas bactérias são capazes de produzir substâncias com ação antimicrobiana e inibidoras:

- i) Toxinas: substâncias tradicionalmente conhecidas como toxinas bacterianas, devido à sua ação tóxica contra células eucarióticas, mas que também apresentam atividade antibacteriana. Exemplos são: toxinas de difteria, tétano e cólera (RILEY, 2002);
- ii) Enzimas bacteriolíticas, tais como lisostafina, fosfolipase A e hemolisina (JACK e TAGG, 1995);
- iii) Subprodutos do metabolismo, tais como amônia, ácidos orgânicos e peróxidos. (JACK e TAGG, 1995);
- iv) Antibióticos como gramicidina, valinomicina e bacitracina, sintetizados por complexos multienzimáticos, em contraste com a síntese ribossomal das bacteriocinas (STEIN, 2005).

A detecção de moléculas inibidoras, em laboratório, depende do estabelecimento de condições de análise apropriadas (pH, temperatura, nutrientes) e que facilitem a interação dessas substâncias com os microrganismos suscetíveis. Deve-se ter cuidado antes de se atribuir o termo “bacteriocina” a um agente antimicrobiano. A simples presença de um halo de inibição não é prova definitiva da ação de bacteriocinas. Segundo Jack e Tagg (1995), alguns dos erros mais comuns ao se atribuir precocemente o termo bacteriocina a um agente são:

- i) Previsões sobre a natureza proteica do agente baseadas apenas na inativação da ação bactericida após a ação de enzimas proteolíticas;
- ii) Estimativas de massa molar baseadas apenas em dados de cromatografia em gel;

- iii) Estudos de espectro de inibição baseados na atividade inibitória total do microrganismo e não apenas na capacidade inibitória da substância purificada.

Segundo Abriouel, Franz e Omar(2011), podemos acrescentar ainda um quarto erro comum:

- iv) Não corroborar a síntese ribossomal da substância, sendo este aspecto crucial em *Bacillus*, um grupo prolífico em peptídeos sintetizados por vias não-ribossomais (como iturinas e surfactina).

À medida que se acumulam informações sobre estruturas e funções das bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, fica cada mais evidente que estas substâncias formam um grupo heterogêneo e que diferem em muitos aspectos do modelo clássico baseado em colicinas. É de suma importância reconhecer e conhecer essas diferenças, pois serão fundamentais para se estabelecer quais parâmetros serão utilizados para a classificação de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas (CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007; HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

5.1) ESPECTRO DE INIBIÇÃO E RECEPTORES:

Colicinas possuem espectros de inibição pequenos, cujos principais alvos são bactérias evolutivamente próximas (CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007). Ainda que o mesmo seja verdade para muitas bacteriocinas de bactérias Gram-positivas, a maior parte é mais ativa e possui espectro bem mais amplo, muitas sendo ativas contra bactérias de outros gêneros que não a de suas bactérias produtoras e, em situações especiais, contra bactérias Gram-negativas (ENNAHAR, SASHIHARA e SONOMOTO, 2000; LEE, 2011).

O estreito espectro de ação das colicinas deve-se ao fato de cada colicina precisar ligar-se a um receptor de membrana específico antes de agir contra a célula alvo. Uma mutação neste receptor pode levar à perda de sensibilidade por parte da célula alvo e, conseqüentemente, à resistência por parte da mesma àquela colicina. As colicinas E (E1, E2, até E9), por exemplo, ligam-se a receptores já caracterizados como proteínas externas de membrana responsáveis pela absorção de nutrientes, tais como nucleosídeos e vitaminas (CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007). A alta

especificidade de ação das colicinas sugere sua utilização como medicamentos, inclusive contra doenças como o câncer (LANCASTER e WINTERMEYER, 2007).

Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas não apresentam, em geral, tal especificidade sendo evidência da menor especificidade do receptor de membranas células alvo (JACK e TAGG, 1995)

Um exemplo de bacteriocina com amplo espectro de ação é a nisina. O espectro de ação da nisina contra bactérias Gram-positivas é relativamente grande e alguns organismos sensíveis e de relevância na indústria de alimentos estão listados no Quadro(1), abaixo. É ativa contra células integras e esporos termorresistentes. Em circunstâncias normais, não é ativa contra leveduras, fungos filamentosos e bactérias Gram-negativas (HOOVER, 2005; THOMAS, 2005). Quando utilizada em conjunto com agentes quelantes, tais como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a nisina passa a apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas (JOZALA, 2005).

Quadro1:Exemplos de organismos sensíveis à Nisina

Espécies Gram-Positivas sensíveis à nisina	
Gênero	Espécie
<i>Alicyclobacillus</i>	<i>A. Acidoterrestris</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. brevis, B. cereus, B. coagulans, B. licheniformis, B. macerans, B. megaterium, B. pumilis, B. subtilis</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C.bifermentans, C. botulinum, C. butyricum, C. histolyticum, C. pasteurianum, C. perfringens, C. putrificum, C. sordelli, C. sporogenes, C. tertium, C. thermosaccharolyticum, C. tyrobutyricum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis, E. faecium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus spp., L. bulgaricus, L. brevis, L. buchneri, L. casei, L. curvatus, L. helveticus, L. fermentum, L. lactis, L. plantarum</i>
<i>Listeria</i>	<i>L. innocua, L. monocytogenes</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>

Fonte: Thomas, 2005 (adaptado)

5.2) ESTRUTURA E SÍNTESE:

Ao contrário das colicinas, moléculas de alto peso molecular, termolábeis, com domínios específicos para ancoramento, translocação e função bactericida; bacteriocinas de bactérias Gram-positivas, em geral, apresentam um baixo peso molecular, termoestabilidade e são catiônicas (CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007; CHAVAN, 2007; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Todas as colicinas estão geneticamente codificadas em plasmídeos, nos quais podem ser encontrados: um gene estrutural, para a produção da proteína; um gene de imunidade (confere imunidade à célula contra seu próprio peptídeo) e um gene de lise (responsável pela liberação da proteína para o ambiente) (RILEY, 2002; HECHT, ZHANG, et al., 2010; CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007).

No caso de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas, os genes associados à síntese estão, em geral, organizados sob a forma de *operon*. Também é possível encontrar o gene estrutural e de imunidade, mas há também genes responsáveis pela produção de proteínas envolvidas em modificações pós-traducionais e genes que codificam proteínas transportadoras, responsáveis pela liberação da bacteriocina para o ambiente. Entretanto, talvez a principal diferença seja o fato de que a localização desses genes não seja, necessariamente, em plasmídeos podendo estar localizados em cromossomos, como é caso da nisina e subtilina (ENNAHAR, SASHIHARA e SONOMOTO, 2000; HENG, WESCOMBE, et al., 2007; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

5.3) MECANISMOS DE AÇÃO:

Há três modos de ação conhecidos para colicinas: (i) formação de poros na membrana da célula, levando ao desequilíbrio iônico e, conseqüentemente, morte celular; (ii) ação enzimática contra DNA, rRNA e tRNA e (iii) quebra da parede celular. Em todos os casos a ação começa com a ligação ao receptor específico de membrana e, em todos os casos, é ação do tipo bactericida. (CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007; RILEY, 2002; RILEY, 1998; CHAVAN, 2007).

Muitas bacteriocinas de bactérias Gram-positivas também agem através da formação de poros na membrana da célula alvo. Exemplos de bacteriocinas que possuem este mecanismo de ação são nisina e subtilina (BONELLI e WIEDEMANN,

2006). Entretanto, há bacteriocinas que atuam inibindo enzimas essenciais, tais como as envolvidas na síntese de parede celular (mersacidina e duramicina)(HENG, WESCOMBE, et al., 2007; DUARTE, 2010).

Há, ainda, exemplos de bacteriocinas que atuam diretamente na parede celular das células alvo, como a lisostafina, e outras que atuam dissipando o potencial de membrana, causando extravasamento de ATP, como *Streptococcus* A-M57 (DUARTE, 2010; HENG, WESCOMBE, et al., 2007). Estudos demonstram que algumas bacteriocinas podem apresentar efeito bacteriostático e não apenas bactericida, sendo esta uma diferença fundamental entre estas bacteriocinas e colicinas (IVANOVA, MITEVA, et al., 1998).

5.4) BIOSÍNTESE LETAL:

A produção de colicinas é reprimida sob condições normais. Entretanto, sob condições de *stress*, agentes indutores de resposta *Save our souls* (SOS), entram em ação e a produção de colicina aumenta. Resposta SOS é um sistema de reparo do DNA que permite à bactéria que sobreviva a danos em seu material genético, como os causados por mitomicina ou radiação UV. Foi descrito pela primeira vez por Miroslav e Radman, em 1975 e sabe-se que colicinas são liberadas durante essa resposta (LANCASTER e WINTERMEYER, 2007; MICHEL, 2005). Esse aumento na produção é acompanhado de lise parcial das células produtoras, resultado da ação de proteínas de lise (CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007).

Ainda não foi documentado o aumento da produção de bacteriocinas por indução SOS. A liberação de bacteriocinas se dá, geralmente, pela ação de transportadores do tipo “ATP-bindingcassette” (ABC).

As bacteriocinas são sintetizadas sob a forma de um pré-peptídeo que contém uma extensão N-terminal ou sequência líder. Posteriormente, ocorre a clivagem e separação desta sequência, tornando a molécula biologicamente ativa. A secreção através da membrana é mediada por um transportador ABC e uma proteína acessória, ambas são proteínas de membrana que integram o sistema de transporte da substância ativa. O domínio proteolítico liga-se à sequência líder do pré-peptídeo, provocando alterações conformacionais no transportador, resultando na clivagem e remoção dessa sequência e externalização da bacteriocina ativa através da membrana (CINTAS, CASAUS e NES, 2001).

Por todas essas diferenças, bacteriocinas de bactérias Gram-positivas possuem uma classificação própria. Por formarem um grupo muito heterogêneo de proteínas e peptídeos, são difíceis de serem classificadas. Há sugestões para a classificação de bacteriocinas produzidas por Gram-positivas, mas ainda não há um esquema definitivo. Por serem as mais estudadas, as bacteriocinas produzidas por BAL serviram de base para a classificação mais utilizada para aquelas produzidas por bactérias Gram-positivas. Isso se dá, pois, como já foi dito anteriormente, muitas estirpes apresentam alto potencial de uso com biopreservativos na indústria de alimentos por serem GRAS (O'SULLIVAN e ROSS, 2002; DUARTE, 2010).

6) CLASSIFICAÇÃO BASEADA EM BAL:

Bactérias lácticas formam um grupo diverso de bactérias Gram-positivas, cuja característica mais marcante, e que dá nome ao grupo, é ter o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (CINTAS, CASAUS e NES, 2001). BAL são catalase negativas, não esporulam, são tolerantes a pH ácido e são aeróbias facultativas ou microaerófilas. Exceto por algumas poucas espécies, não são patogênicas e possuem *status* de GRAS (MAYO, ALEKSANDRZAK-PIERKACZYK, et al., 2010).

BAL são importantes para a indústria de alimentos, pois, além de serem encontradas como contaminantes naturais em laticínios, vegetais, cereais, carnes e produtos cárneos, muitas espécies são utilizadas para produção ou preservação de alimentos e outras são utilizadas como iniciadoras de fermentação (*starter cultures*). Além disso, muitas dessas bactérias contribuem para as características organolépticas, reológicas e nutricionais finais de produtos fermentados (VÁSQUEZ e SÚAREZ, 2009; HOOVER, 2005; MAYO, ALEKSANDRZAK-PIERKACZYK, et al., 2010).

Diferentes gêneros bacterianos são classificados como BAL, entre eles destacam-se: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*. Sob uma perspectiva bioquímica, BAL são tanto homofermentadores, produzindo principalmente ácido láctico, quanto heterofermentadores, com muitos produtos de fermentação, tais como ácido acético, etanol, dióxido de carbono e ácido fórmico (CINTAS, CASAUS e NES, 2001) (MAYO, ALEKSANDRZAK-PIERKACZYK, et al., 2010).

A classificação apresentada aqui é a mesma apresentada por Ceotto (2010) e divide as bacteriocinas em três classes distintas: Classe I ou lantibióticos, Classe II e Classe III, com suas respectivas subdivisões, e levam em conta características estruturais e modos de ação. É importante ressaltar que esta não é uma classificação definitiva, com muitos autores ainda apresentando classificações diferentes como, por exemplo, Heng, Wescombe et al.(2007) que incluem uma Classe IV, de bacteriocinas cíclicas e que, na classificação aqui apresentada, estão incluídas na subclasse IIc. Outras subclasses apresentadas por Ceotto (2010) são o tipo D, da Classe I e a subclasse IIe, cujas características e justificativas para modificação estão apresentadas no texto.

6.1) CLASSE I OU LANTIBIÓTICOS:

A classe I ou Lantibióticos abrange peptídeos pequenos, menores que 5kDA, e termoestáveis. Caracteriza-se pela presença de aminoácidos modificados após a tradução, lantionina e β -metil-lantionina, e aminoácidos desidratados. Segundo Heng, Wescombe, et al.(2007), somente bactérias Gram-positivas foram descritas como produtoras de lantibióticos e estes apresentam atividade predominantemente, quando não exclusivamente, contra bactérias Gram-positivas. Na biossíntese de lantibióticos há, primeiramente, a formação do pré-peptídeo, seguidas as reações de desidratação e ligação cruzada, clivagem do peptídeo-líder e posterior secreção (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011; DUARTE, 2010; JACK e TAGG, 1995).

Além dos genes estruturais envolvidos na formação dos pré-peptídeos (lanA), as células produtoras também possuem os genes para codificação das enzimas de modificação (LanB, LanC/LanM), para proteases responsáveis pela remoção do peptídeo-líder, proteínas de secreção, regulação e os genes envolvidos no mecanismo de imunidade da célula às suas próprias bacteriocinas (LanH, LanI/LanEFG). Os lantibióticos podem ainda ser subdivididos em quatro tipos: A,B,C e D (HENG, WESCOMBE, et al., 2007; DUARTE, 2010).

Conforme ilustrado na Figura 1, alguns lantibióticos, como a nisina, podem apresentar dois mecanismos de ação distintos podendo ligar-se ao lipídeo II e, assim, inibir a síntese da parede celular. Adicionalmente, também podem utilizar o lipídeo II como âncora para se inserirem na membrana e formar poros. Bacteriocinas de classe II, geralmente, possuem uma estrutura helicoidal anfipática que favorece a inserção na membrana celular com consequente despolarização. As bacteriolisinas

(pertencentes à classe III) podem atuar diretamente sobre a parede celular, degradando-a.

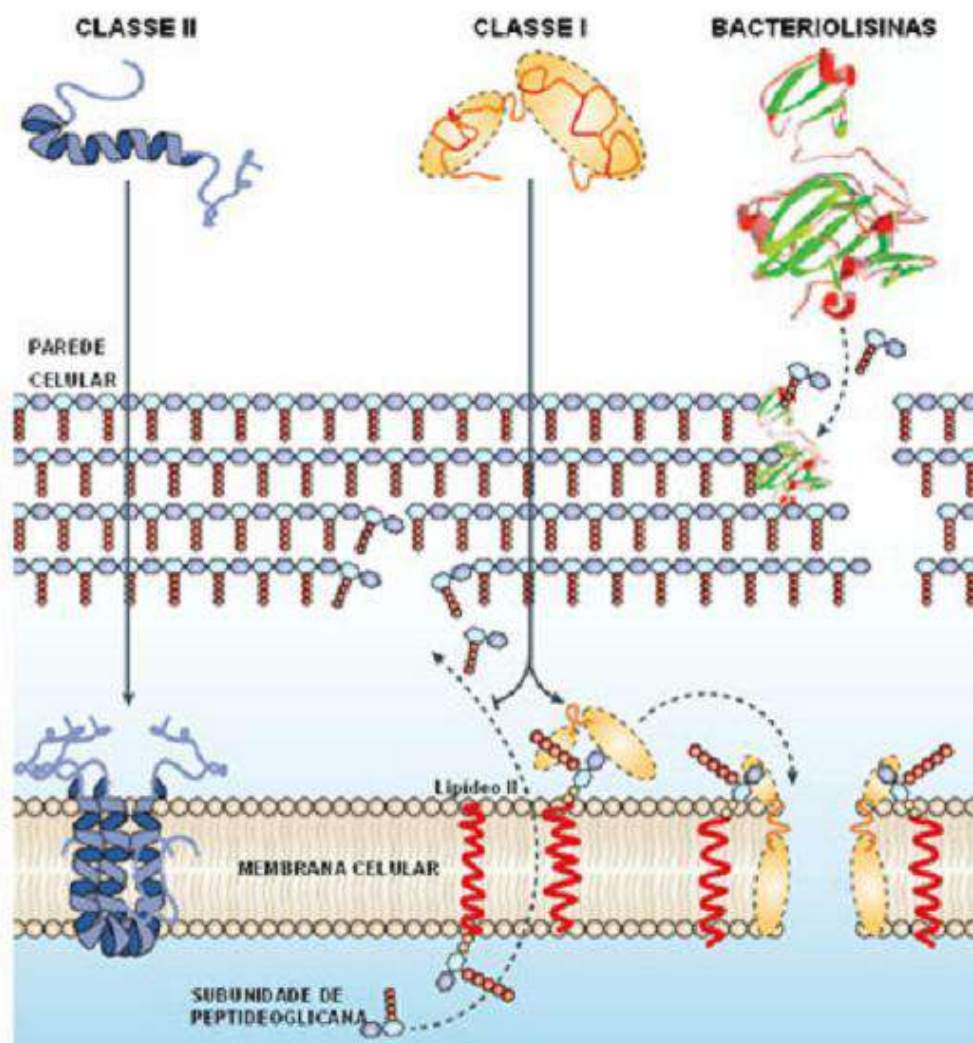


Figura 1: Ilustração de alguns modos de ação de bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.

Fonte: CEOTTO, (2009) (adaptado).

6.1.1) TIPO A:

O Tipo A é composto por peptídeos de estrutura alongada, flexível, geralmente com 34 resíduos de aminoácidos, catiônicos e com modo de ação de formação de poros nas membranas plasmáticas das células alvo. De acordo com as enzimas de modificação, podem, ainda, ser classificados em subtipos AI e AII (DUARTE, 2010; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

A principal diferença entre os lantibióticos do subtipos AI e AII é que os anéis de tioéter do subtipo AII são formados pela ação de uma enzima bifuncional, LanM, e não pela ação de duas enzimas, LanA e LanB, como no caso do subtipo AI (DUARTE, 2010; HENG, WESCOMBE, et al., 2007) . Além disso, sua sequência peptídica líder parece-se muito com àquelas de bacteriocinas da classe II, pois possuem um padrão de “glicina-dupla” imediatamente antes ao sítio de clivagem do peptídeo líder (HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

O lantibiótico mais conhecido e estudado do Subtipo AI é a nisina(Figura 2) (HENG, WESCOMBE, et al., 2007; COLLINS, COTTER e HILL, 2010). A nisina foi descoberta por Rogers, em 1928, e é utilizada há 40 anos na preservação de alimentos. Além disso, investigações apontam para sua potencial utilização em medicina e como espermicida (HENG, WESCOMBE, et al., 2007). Mattick e Hirsch, em 1947, foram os primeiros a caracterizarem essa molécula, nomeando-a nisina devido ao termo *N inhibitory substance* (substância inibitória N, em tradução livre) e seu primeiro produto comercial foi desenvolvido por Aplin & Barrett Ltd. em 1957 (THOMAS, 2005).

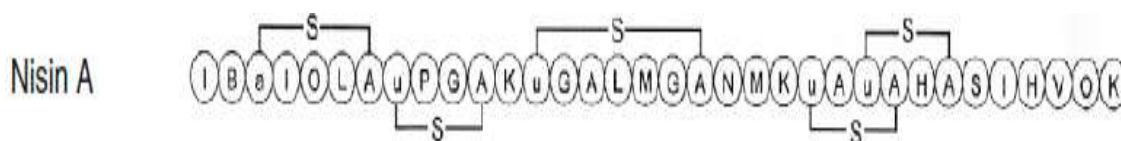


Figura 2: Estrutura do lantibiótico Nisina A (Subtipo AI).

Fonte: Heng & Wescombe, 2007. (ADAPTADO)

A nisina é produzida por *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*, tem massa molar de 3,5 kDa e sua biossíntese ocorre em duas fases: o peptídeo precursor é codificado pelo gene *nisA* e sofre a ação das proteínas NisB e NisC, que desidratam resíduos específicos de Serina(Ser) e Treonina(Thr). Alguns formam ligações tioéter com

resíduos de Cisteína(Cys) localizados, geralmente, na região carboxi-terminal. NisT é um transportador-ABC, responsável pela exportação do peptídeo já modificado e NisP é um protease ancorada à membrana capaz de clivar o peptídeo líder e liberar a nisina ativa. A proteína de imunidade da célula produtora à sua própria nisina é NisI(JOZALA, 2005; HENG, WESCOMBE, et al., 2007; HOOVER, 2005).

Possui uma estrutura tri-dimensional flexível, determinada, principalmente por seus anéis de tioéter e pode formar dímeros e oligômeros. Possui atividade emulsificante, mas esta atividade é dependente de pH e concentração de nisina. Quando em pó é extremamente estável a temperaturas de até 25°C, ao abrigo da luz e umidade. Além de estável, não altera o gosto dos alimentos aos quais é adicionada (THOMAS, 2005).

6.1.2) TIPO B:

O tipo B é composto por peptídeos globulares, com mais de 19 resíduos de aminoácidos e que atuam inibindo enzimas essenciais, tais como as envolvidas na síntese de parede celular, sendo neutro ou negativamente carregados em pH neutro. Mesarcidina, cinamicina (Figura 3), duramicina e actagardina são exemplos de lantibióticos desse subtipo, sendo a mesarcidina considerada o lantibiótico modelo do grupo (HENG, WESCOMBE, et al., 2007; DUARTE, 2010) .

A mesarcidina (Figura 3), produzida por *Bacillus* ssp. HIL Y-85,54728, é um peptídeo com 20 aminoácidos, de massa molar 1,85 kDa e que apresenta três anéis de metil-lantionina, mas nenhuma lantionina (CHATTERJEE, CHATTERJEE, et al., 1992). Este lantibiótico não forma poros na membrana celular da bactéria alvo. Age inibindo a síntese de peptidoglicano através da interação específica com o precursor deste. Já foi demonstrado que é efetivo no tratamento de infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus* (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

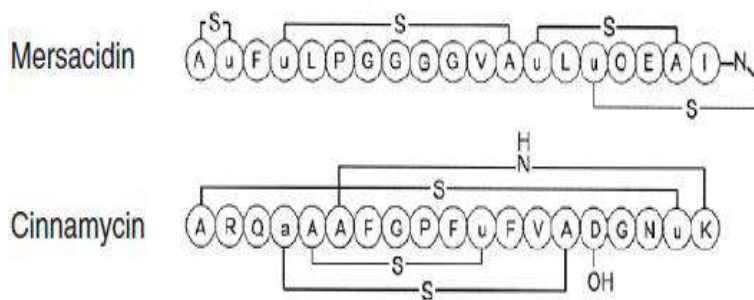


Figura 3::Estruturas dos lantibióticos Mersacidina (Tipo B) e Cinamicina (Tipo B)

Fonte: Heng & Wescombe, 2007. (ADAPTADO)

Outro lantibiótico do subtipo B é a cinamicina, um peptídeo de 19 aminoácidos produzido por *Streptomyces cinnamoneus*, cuja estrutura apresenta dois resíduos de metil-lantionina. Foi demonstrado que a cinamicina é inibidor de fosfolipase A2, uma enzima envolvida na síntese de prostaglandinas no sistema imune humano (HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

6.1.3) TIPO C:

O tipo C é de bacteriocinas compostas por dois peptídeos ativos quando atuam em sinergismo, mas que são inativos quando separados. A lacticina 3147 (Figura 4), produzida por *Lactococcus lactis* DPC3147, é um exemplo de lantibiótico do subtipo C. É composto por dois peptídeos: LtnA1, cuja estrutura possui semelhanças com as dos lantibióticos do tipo B, e LtnA2, que possui estrutura semelhante às do tipo AII. Uma vez que ambos os componentes apresentam aminoácidos modificados após a tradução, mais especificamente, lantionina e metil-lantionina, torna-se necessário, para que seja possível a síntese de ambos, que duas enzimas LanM sejam sintetizadas. O mecanismo de ação depende de ação sequencial de ambos os peptídeos componentes: primeiro, LtnA1 liga-se ao lipídio II, precursor de peptídeoglicano, seguido da interação do LtnA2 com o complexo LtnA1-lipídio II (MCAULIFFE e ROSS, 2000; HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

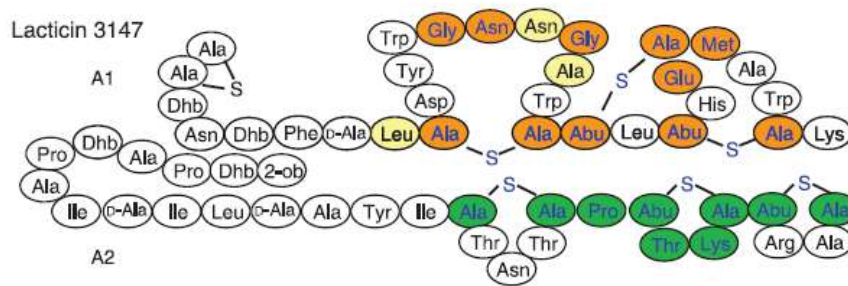


Figura 4: Estrutura do lantibiótico Tipo C lacticina 3147

Fonte: ABRIQUEL, 2010 (ADAPTADO)

6.1.4) TIPO D:

Bierbaum (2009) propôs a criação de um novo tipo de lantibióticos (a Classe III) cujas principais características seriam sua limitada ação antimicrobiana e, em alguns casos, inexistente ação bactericida, mas com função morfogenética. A classe III foi incorporada na classificação dada por CEOTTO (2009) como o Tipo D como, por exemplo, SapT e SapB.

6.2) CLASSE II:

A classe II é composta de peptídeos pequenos, menores que 10 kDa, termoestáveis e que não apresentam aminoácidos modificados após a tradução, ao contrário dos lantibióticos. Esses peptídeos interagem com receptores de membrana e sua estrutura helicoidal permite que se insiram na membrana plasmática das células alvo. Isto leva à formação de poros, despolarização de membrana, causando morte celular.

As bacteriocinas de classe II são codificadas por, pelo menos, quatro genes: o gene codificador do peptídeo-líder; o responsável pelo sistema de imunidade da célula à sua própria bacteriocina; gene responsável pela proteína transportadora, envolvida no processamento e/ou secreção e o envolvido em codificar a proteína acessória.

Assim como para classe I, a classe II também apresenta subdivisões: subclasses IIa, IIb, IIc e IId.

6.2.1) SUBCLASSE IIa:

A subclasse IIa é composta por bacteriocinas de reduzido espectro de ação e caracterizadas pela significativa atividade específica contra *Listeria monocytogenese* uma sequência consenso N-terminal YGNGVXaaC (DUARTE, 2010; ENNAHAR, SASHIHARA e SONOMOTO, 2000). Acredita-se que esta sequência consenso esteja relacionada com o reconhecimento do peptídeo pelo receptor de membrana. Peptídeos deste grupo são formados por 37 a 58 aminoácidos e são chamados, também, de bacteriocinas do tipo pediocina. Bacteriocinas de Classe IIa são abundantes em BAL, bactérias efetivas em controle microbiológico de alimentos. Entretanto, a utilização direta de bacteriocinas desse tipo ainda encontra-se em estágio experimental. A pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici* (HENG, WESCOMBE, et al., 2007), é um exemplo de peptídeo com potencial aplicação como conservante e há patentes sobre sua utilização em carnes e queijos (ENNAHAR, SASHIHARA e SONOMOTO, 2000).

6.2.2) SUBCLASSE IIb:

A subclasse IIb é formada por bacteriocinas de dois peptídeos, podendo ser classificadas em tipos E e S, sendo o tipo E aquele que os peptídeos formadores são ativos quando separados, mas que possuem atividade ampliada quando juntos e o tipo S aquelas em que os peptídeos só apresentam atividade quando juntos. A termofilina 13, produzida por *Streptococcus thermophilus* (MARCISSET, JERONIMUS-STRATINGH e MOLLET, 1997), e a lactococina G, produzida por *Lactococcus lactis* (ALLISON, WOROBO e STILES, 1995), são exemplos do tipo E e S, respectivamente.

Estes peptídeos permeabilizam a membrana das células sensíveis para diferentes pequenas moléculas e parecem possuir especificidade a esse respeito. Por exemplo, a lactococina G permeabiliza a membrana para cátions monovalentes, como Na⁺ e K⁺, mas não para cátions divalentes, como o Mg²⁺, ou ânions, como o fosfato, e H⁺.

Ao contrário de outras bacteriocinas de dois componentes, a termofilina 13 possui amplo espectro de ação e, além disso, há relatos de que é capaz de formar poros em lipossomos que contêm citocromo c oxidase, uma atividade vista antes apenas em lantibióticos (MCAULIFFE e ROSS, 2000).

6.2.3) SUBCLASSE IIc:

Subclasse IIc é composta por peptídeos cíclicos cujos primeiro e o último aminoácidos do peptídeo final estão ligados covalentemente. Todas as bacteriocinas pertencentes à esta subclasse são catiônicas, hidrofóbicas e de massa molar entre 3,2 e 7,2 kDa. Além disso, seu modo de ação consiste na permeabilização da membrana das células-alvo e dissipação do potencial de membrana, levando à morte celular. Estudos sugerem que a configuração cíclica dessas bacteriocinas confere resistência a proteases e favoreça a estabilidade.

Enterocina AS-48 foi a primeira bacteriocina cíclica a ser identificada e é considerada modelo da subclasse IIc. Contém 70 resíduos de aminoácidos e é produzida por muitas estirpes de *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*. Possui um amplo espectro antibacteriano, agindo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Análise de sua estrutura em solução aquosa (pH 3,0) revelou uma estrutura globular composta por cinco α -hélices formando um núcleo hidrofóbico.

Gassericina A, produzida por *Lactobacillus gasserii* LA39, e reutericina6, produzida por *Lactobacillus reuteri* LA6, são bacteriocinas cíclicas, de 58 resíduos cada e com sequências de aminoácidos idênticas. Entretanto, gassericina A contém dois resíduos de D-alanina, enquanto a reutericina6 contém apenas um. Esta diferença mínima pode explicar as diferenças em amplitude do espectro de ação (gassericina possui um espectro maior).

6.2.4) SUBCLASSE IIId:

Na subclasse IIId estão agrupadas as bacteriocinas de um único peptídeo linear do tipo não pediocina. Lactocina A é um exemplo de bacteriocina da subclasse IIId (DUARTE, 2010).

Lactococcina A é produzida por algumas estirpes de *Lactococcus lactis* e foi uma das primeiras bacteriocinas da subclasse IId a serem isoladas e caracterizadas. É inicialmente sintetizada como um pré-peptídeo de 75 resíduos com duas regiões principais: uma sequência líder com 21 resíduos de aminoácidos e uma segunda região, de 54 resíduos que é a bacteriocina “madura”.

Possui um espectro de ação relativamente pequeno e age permeabilizando a membrana celular da célula alvo. Assim como as bacteriocinas da subclasse IIa, liga-se a permease do *specific mannose phosphotransferase system* (PTS), mais especificamente à região da permease que se encontra inserida na membrana. O sistema de imunidade contra lactococcina produz uma proteína que reconhece o complexo lactococcina A – permease, liga-se a este e previne a permeabilização da membrana.

6.2.5) SUBCLASSE IIE:

A subclasselle é uma subclasse proposta por Ceotto (2009) e que inclui complexos compostos por três ou mais peptídeos. É composta apenas pela aureocina A70, produzida por *S. aureus* A70 (descrita em mais detalhes adiante). Em outras classificações a aureocina A70 é classificada como pertencente à subclasse IId (NISSEN-MEYER, ROGNE, *et al.*, 2009), apesar de ser conhecida a sua estrutura como um complexo de quatro peptídeos. Como a subclasse IId é composta por peptídeos únicos, uma nova subclasse foi proposta (CEOTTO, 2009).

6.3) CLASSE III:

Os peptídeos maiores que 10 kDa são pertencentes à classe III. Geralmente são termolábeis, exceto a propionicina SM1 um agente inibidor termoestável produzido por *Propionium bacterium*. De acordo com o modo de ação, seja através de enzimas bacteriolíticas ou através da ação de proteínas não líticas, podem ser subdivididos em subclasses IIIa e IIIb, respectivamente (HENG, WESCOMBE, *et al.*, 2007; JACK e TAGG, 1995; DUARTE, 2010).

6.3.1) SUBCLASSE IIIA:

A subclasse IIIa atua diretamente na parede celular de bactérias Gram-positivas com conseqüente lise celular. A parede celular das bactérias produtoras de bacteriocinas de subclasse IIIa, em geral, apresentam modificações que conferem resistência a essas, visto que nem sempre apresentam os genes de imunidade. Lisostafina é um exemplo desta subclasse (HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

Lisostafina, produzida por *Staphylococcus simulans*, é considerada a bacteriolisina modelo da subclasse IIIa e está entre as bacteriocinas maiores que 10kDa mais estudadas. A lisostafina hidroliza as ligações cruzadas de pentaglicina em peptídeo-glicano da parede celular das células alvo com conseqüente desestabilização da parede e morte celular. Devido à atividade bactericida da lisostafina sobre membros de todas as espécies de *Staphylococcus* conhecidas, há sugestões de seu uso para fins medicinais (HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

Há sugestões de que a molécula lisostafina seja composta por dois domínios distintos separados por uma sequência *linker* (conectora ou encadeadora): a) um domínio peptidase N-terminal, responsável pela atividade catalítica da proteína e b) um domínio C-terminal envolvido na ligação entre a molécula e o substrato peptídeo-glicano.

6.3.2) SUBCLASSE IIIB:

As bacteriocinas pertencentes à subclasse IIIb agem dissipando o potencial de membrana, extravasamento de ATP e, conseqüentemente, morte celular, sendo helvecitina J, disgalacticina e *Streptococcus* A-M57 exemplos desta subclasse (DUARTE, 2010; HENG, WESCOMBE, et al., 2007).

A primeira bacteriocina não-lítica a ser descrita em níveis bioquímico e genético foi a helvecitina J. Helvecitina J é uma bacteriocina de 37 kDa, produzida por *Lactobacillus helveticus* e tem como alvos principais outras espécies de *Lactobacillus*.

Disgalacticina é uma bacteriocina de 21kDa produzida por *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equismilis* e estreptococcina A-M57 (*streptococcin* A-M57 ou SA-M57) é uma bacteriocina de 17kDa produzida por *Streptococcus pyogenes*. O espectro de inibição da disgalacticina é pequeno e limitado aos sorotipos A,C e G de

Lancefield, enquanto o espectro da AS-M57 é bastante incomum, sendo ativa, principalmente, contra Gram-positivas de espécies que não pertencem ao gênero *Streptococcus*. A classificação aqui apresentada encontra-se esquematizada na Quadro (2).

Quadro2: Classificação baseada em BAL

Classes	Características	Subclasses	Mecanismos de Ação	Exemplos
Classe I (lantibióticos)	Peptídeos pequenos (< 5 kDa) contendo aminoácidos pouco comuns, como lantionina e β-metil-lantionina, e aminoácidos desidratados após a tradução, como dideidroalanina e dideidrobutirina	Tipo A: flexíveis e alongados	Atuam diretamente sobre a membrana Plasmática	Nisina
		Tipo B: peptídeos com estrutura globular	Atuam por inibição enzimática da biossíntese da parede celular	Mesarcidina Cinamicina
		Tipo C: lantibióticos de dois componentes		Lacticina 3147
		Tipo D: atividade antimicrobiana reduzida, ou sem atividade Bactericida		SapT
Classe II	Peptídeos pequenos (< 10 kDa), que não apresentam aminoácidos modificados	Ila: peptídeos do tipo pediocina	Inserem-se na membrana plasmática das células alvo, levando a formação de poros	Pediocina PA-1
		Ilb: complexo formado por dois peptídeos		Lactococcina G
		Ilc: bacteriocinas cíclicas		Enterocina AS-48

		IId: bacteriocinas compostas por um único peptídeo, que Classe II não sofre modificações após a tradução, e que não é do tipo pediocina		Aureocina A53
		Ile: complexos compostos por três ou mais peptídeos		Aureocina A70
Classe III	Peptídeos maiores do que 10 kDa e geralmente termolábeis	IIIa: bacteriolisinas	Atuam diretamente na parede celular	Lisostafina
		IIIb: bacteriocinas não líticas	Agem no potencial de membrana, causando extravasamento de ATP	Helvecitina J
Fonte: CEOTTO, 2009 (ADAPTADO)				

7) ESTAFILOCOCCINAS

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Staphylococcaceae e é composto por 46 espécies e 24 subespécies, de acordo com Euzéby (2012 A). *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, aeróbios facultativos, catalase-positivos (alguns são catalase-negativos) e possuem entre 30 – 39% de G+C em seu genoma, um percentual considerado pequeno. Sua divisão celular pode se dar em mais de um plano, dando origem cachos irregulares, característica marcante e que dá nome ao gênero - o termo grego “staphylé” significa cacho de uva .O gênero *Staphylococcus* encontra-se amplamente difundido na natureza, sendo encontrado na pele e mucosas de mamíferos e pássaros, na boca, nas glândulas mamárias e nos tratos intestinal, gênito-urinário e respiratório superior. Ainda que a relação com o hospedeiro seja comensal ou simbiótica, em alguns casos, quando há rompimento do tecido ou baixa

de imunidade por parte do hospedeiro, infecções estafilocócicas podem ocorrer (BANNERMAN, 2007).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* podem ser divididas em dois grupos de acordo com a capacidade ou não de produzir coagulase, enzima capaz de coagular o plasma sanguíneo. As bactérias produtoras são chamadas de coagulase-positivas (SCP) e as não produtoras são chamadas de coagulase-negativa (SCN) (BASTOS, CEOTTO e COELHO, 2009).

As SCN são patógenos oportunistas infectando, principalmente, pacientes imuno comprometidos e em tratamento hospitalar intensivo. As principais patologias causadas por essas bactérias são as relacionadas com procedimentos médicos invasivos, endocardite, peritonite, endofitalmite, meningite, entre outras infecções. A espécie *Staphylococcus epidermidis* é responsável pela maioria das infecções relacionadas a dispositivos médicos (BASTOS, CEOTTO e COELHO, 2009; FAGUNDES, 2008).

Muitas espécies de SCN possuem o *status* GRAS, presentes na fabricação de muitos produtos alimentícios. Muitas reações envolvidas no desenvolvimento do aroma e sabor, durante a maturação de alimentos fermentados, principalmente queijos, contam com a participação de SCN. São utilizadas como cultura iniciadora de processos fermentativos, especialmente em produtos cárneos, como salsichas (COELHO, NASCIMENTO, et al., 2007; FAGUNDES, 2008).

O grupo SCP é representado, principalmente, pela espécie *Staphylococcus aureus*, um patógeno agressivo, cujo habitat mais comum é o trato respiratório. Geralmente coloniza o hospedeiro de forma assintomática, mas em casos de comprometimento do sistema imunológico, pode se tornar patogênico. Pode causar infecções na pele e tecidos moles, tais como furúnculos, em tecidos profundos, como ossos, no pulmão, trato urinário e intoxicações alimentares, entre outras manifestações. O fato de poder causar intoxicações alimentares faz do *S. aureus* um importante agente a ser considerado na indústria de alimentos (BANNERMAN, 2007).

Algumas estafilococcinas, produzidas tanto por SCN quanto por SCP, já foram bem caracterizadas e estão classificadas segundo os critérios estipulados para BAL. A Pep5, Epicidina 280, Epidermina e Epilancina K7 são produzidas por *S. epidermidis*5, *S. epidermidis* BN280, *S. epidermidis* Tü3298 e *S. epidermidis* K7, respectivamente. Estafilococcinas produzidas por *S. aureus* também são conhecidas, em especial a aureocina A53, produzida por *S. aureus*A53 e Aureocina A70, produzida por *S. aureus*A70 (BASTOS, CEOTTO e COELHO, 2009; BIERBAUM, GÖTZ, et al., 1996; FAGUNDES, 2008; FONTANA e DE BASTOS, 2006).

7.1) ESTAFILOCOCCINAS PRODUZIDAS POR SCN:

Pep5 (Figura 5) é um lantibiótico do tipo A, de 34 aminoácidos, com 3.488 Da de massa molecular, produzido por *S. epidermidis*5. É codificado por um plasmídeo de 20kb (pED503) que contém o gene estrutural e os genes de imunidade, transporte e os genes codificadores de uma proteína envolvida no processamento pós-tradução da bacteriocina. Estudos recentes demonstraram sua atividade contra bactérias envolvidas em casos de infecção em paciente “cateterizados”, ou seja, pacientes com cateteres intravasculares, especialmente estirpes de *S. epidermidis* e *S. aureus* (BIERBAUM, GÖTZ, et al., 1996; FONTANA e DE BASTOS, 2006).

A epicidina 280 é um peptídeo de 30 aminoácidos e massa molar de, aproximadamente, 3kDa, produzido por *S. epidermidis* BN280. É classificado como um lantibiótico do tipo A. Estudos realizados entre epicidina 280 e pep5 revelaram 75% de similaridade e 54,9% de identidade entre suas sequências peptídicas, com 33 aminoácidos idênticos e exibem o mesmo espectro de ação (FONTANA e DE BASTOS, 2006; HEIDRICH, PAG, et al., 1998).

Epidermina (Figura 5), primeiramente isolada de *S. epidermidis* Tü3298, é classificada como lantibiótico, possui 22 aminoácidos e massa molar de, aproximadamente, 2,1 kDa. Epidermina e suas variantes aparentam ser o tipo mais comum de estafilococcina produzida por SNC, tendo sido isolada de outras estirpes de *S. epidermidis* e de outras espécies de *Staphylococcus*. Como a pep5, demonstrou ser eficaz contra espécies envolvidas em infecções hospitalares, assim como contra espécies envolvidas em mastite bovina.

A epilancina K7 (Figura 5) foi descoberta por PULVERER e JELJASZEWCZ (1976) e teve sua estrutura elucidada por van de Kamp et al. (1995). É formada por 31 aminoácidos e possui massa molar de 3,0 kDa. Contém seis resíduos de lisina e um grupo carboxi C-terminal livre. Possui, também, anéis duplos C-terminal parecidos com os que são encontrados na subtilina e na nisina, bacteriocinas produzidas por *Bacillus subtilis* e *Lactococcus lactis*, respectivamente. De fato, o segundo anel encontrado na epilancina K7 é idêntico ao quarto anel da subtilina. O quadro (3) mostra algumas bacteriocinas produzidas pelo gênero *Staphylococcus*.

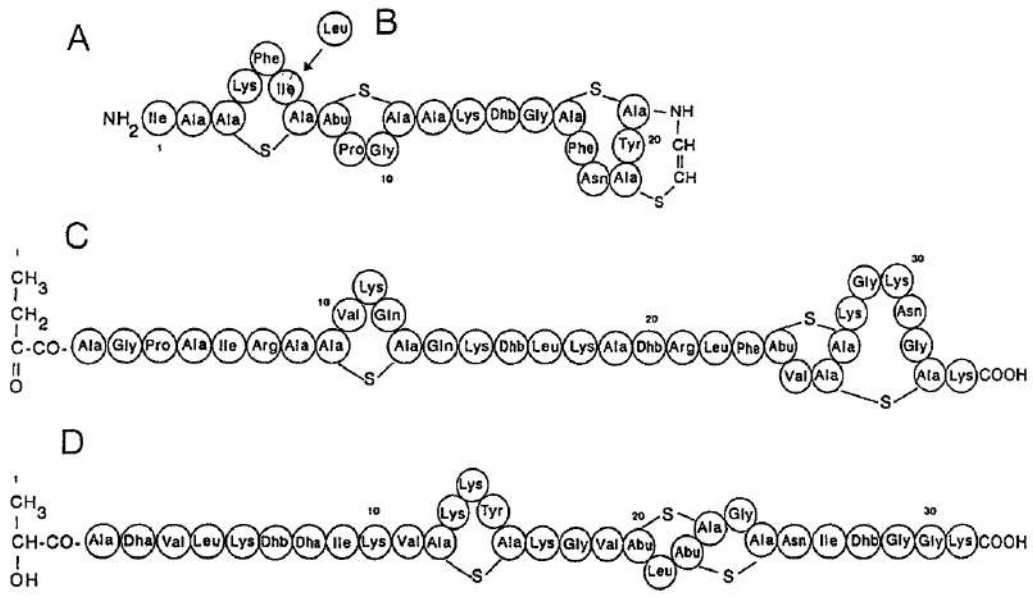


Figura 5: Estrutura dos lantibióticos Epidermina (A), Galidermina (B), Pep5 (C) e Epilancina K7 (D)

Fonte: (BIERBAUM, GÖTZ, *et al.*, 1996) (Adaptado

Quadro3: Bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* spp.

Bacteriocina	Estirpe Produtora	Classe	Massa Molecular	Referências
Pep5	<i>S. epidermidis</i> 5	I	3,48 kDa	(BIERBAUM, GÖTZ, <i>et al.</i> , 1996)
Epilancina K7	<i>S. epidermidis</i> K7	I	3kDa	
Epidermina	<i>S. epidermidis</i> Tü3298	I	2,16 kDa	
Epicidina 280	<i>S. epidermidis</i> BN280	I	3kDa	(HEIDRICH, PAG, <i>et al.</i> , 1998)
Aureocina A53	<i>S. aureus</i> A53	II	6,02 kDa	(NETZ, POHL, <i>et al.</i> , 2002)
Aureocina A70	<i>S. aureus</i> A70	II	Quatro peptídeos variando entre 2,9 e 3,08 kDa	(NETZ, POHL, <i>et al.</i> , 2002)

Fonte: DUARTE (2010) (ADAPTADO)

7.2) ESTAFILOCOCCINAS PRODUZIDAS POR SCP:

Aureocina A53 é um peptídeo de 51 resíduos de aminoácido, massa molar 6,0 kDa, rico em triptofano, catiônico e estável em altas temperaturas e em meio ácido. Possui resistência à ação de proteases: em 18h de incubação com tripsina, à 37°C, aproximadamente 95% dos peptídeos permaneceu intacto. Está classificada como bacteriocina de Classe II, subclasse d, segundo a classificação baseada em BAL e é produzida por *S. aureus* A53. Foi isolada do leite comercial e é codificada pelo plasmídeo pRJ9, de 10,4 kb. Seu espectro de ação é amplo, possuindo atividade contra bactérias de diversos gêneros, entre eles *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e outras estirpes de *S. aureus* (FAGUNDES, 2008; NETZ, POHL, *et al.*, 2002).

Apresenta uma conformação rígida em meio aquoso, característica esta que a aproxima das defensinas, peptídeos antimicrobianos produzidos por células eucarióticas. Há evidências sugerindo que os resíduos de triptofano estejam expostos na superfície do peptídeo. Estes resíduos, sabe-se, tem papel importante na interação entre peptídeos antimicrobianos e membranas biológicas. Tudo isso sugere que a

aureocina A53 compartilhe modo de ação com outros peptídeos também ricos em triptofano (NETZ, POHL, et al., 2002).

Aureocina A70 é uma bacteriocina produzida por *S. aureus* A70, com amplo espectro de ação, sendo eficaz na inibição de bactérias Gram-positivas, dentre elas espécies do gêneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Listeria*, incluindo *Listeria monocytogenes* (FAGUNDES, 2008; BASTOS, CEOTTO e COELHO, 2009; DUARTE, 2010).

A aureocina A70 é codificada por um plasmídeo de 7,9 kb, o pRJ6. Sua massa molaré de, aproximadamente, 3,0 kDa, com 30 resíduos de aminoácidos, é termoestável e foi isolada de leite comercial. Está disseminada pelo gênero *Staphylococcus* tendo sido detectada em outras estirpes de *S. aureus*, incluindo algumas isoladas de mastites bovinas e de casos clínicos (BASTOS, CEOTTO e COELHO, 2009; NETZ, SAHL, et al., 2001).

É a única bacteriocina conhecida a apresentar quatro componentes. Entretanto, sua atividade não está sempre vinculada à presença desses quatro peptídeos, sendo que em alguns casos há atividade mesmo quando se consideram os peptídeos individualmente. Os quatro peptídeos formadores são AurA, AurB, AurC e AurD. Quando testada a atividade contra *S. aureus* e *Listeria innocua*, apenas com os quatro juntos verificou-se atividade. Já contra *Micrococcus luteus*, AurA, AurB e AurC exibem atividade individualmente. AurD não apresentou atividade antimicrobiana individualmente (FAGUNDES, 2008; NETZ, SAHL, et al., 2001).

8) BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *BACILLUS*:

Segundo Euzèby (2012 B), o gênero *Bacillus* é composto por 254 espécies e 7 subespécies. Filogeneticamente, bactérias pertencentes a esse gênero fazem parte da classe I do filo Firmicutes. São Gram-positivas, aeróbias facultativas, esporogênicas, possuem a forma de bastonete, catalase-positiva e são ubíquas.

Bactérias do gênero *Bacillus* podem ser encontradas em diversos ambientes, tais como solo, rochas, areia, ambientes aquáticos, plantas, alimentos e trato gastrointestinal. Esta capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes se deve a seus endósporos resistentes ao calor, desidratação, desinfetantes e esterilização. Por formarem um grupo heterogêneo, essas bactérias apresentam muitas diferenças em suas propriedades fisiológicas individuais, em especial nas habilidades de degradar substratos diferentes, derivados tanto de fontes vegetais quanto de animais, incluindo celulose, amido, proteínas, ágar, hidrocarbonetos e, até mesmo, biocombustíveis.

Além disso, podem apresentar propriedades como: nitrificação, nitrofixação, precipitação de ferro, oxidação de selênio e serem termófilos (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Membros do gênero *Bacillus* são considerados bons produtores de substâncias antimicrobianas, incluindo antibióticos peptídicos e lipopeptídicos e bacteriocinas. A produção dessas substâncias - acredita-se - também contribuiu para capacidade de sobreviver em diferentes habitats, uma vez que seriam capazes de eliminar microrganismos concorrentes. Bactérias do gênero *Bacillus* são de especial interesse para a indústria de alimentos por estarem, muitas vezes, envolvidas na deterioração de alimentos e em casos de intoxicação/infecção alimentar. Entretanto, a presença de *Bacillus* não implica sempre em problemas para a indústria. Algumas espécies são utilizadas na produção como culturas iniciadoras de fermentação (*Bacillus subtilis*) e a estirpe *Bacillus cereus* ssp.*toyoi* é utilizada em ração animal devido às suas propriedades probióticas (LODEMANN e LORENZ, 2008; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Bacteriocinas produzidas por *Bacillus*, por falta de classificação específica, são muitas vezes classificadas utilizando-se o esquema para BAL. Entretanto, alguns lantibióticos descritos recentemente, como a paenibacilina e sublancina 168 (NES IF, 2007) não se encaixam em nenhuma das classes descritas anteriormente. Recentemente, Abriouel, Franz e Omar (2011) propuseram um esquema de classificação específico para o gênero, ainda que algumas moléculas produzidas por *Bacillus* e BAL sejam similares.

Pela proposta, as bacteriocinas também estariam divididas em três classes: classe I, que abrange peptídeos modificados após a tradução e, por sua vez, é subdividida em quatro subclasses; classe II, abrangendo peptídeos não modificados e subdividida em três subclasses e classe III, na qual estão incluídas grandes proteínas (10 a 30 kDa) e não tem subdivisão.

8.1) CLASSIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS PRODUZIDAS POR *BACILLUS*:

8.1.1) CLASSE I:

Segundo o proposto, a Classe I inclui peptídeos antimicrobianos que sofrem processamento após a tradução. As subclasses I.1, I.2 e I.3, abrangem os peptídeos

com modificações características de lantibióticos, tais como: formação de lantionina e β -metil lantionina. Na subclasse I.2 estão inseridos lantibióticos B globulares como a mersacidina. A subclasse I.3 também inclui lantibióticos compostos por dois peptídeos, tais como haloduracina e a subclasse I.4 inclui subtilosina A, um peptídeo cíclico (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

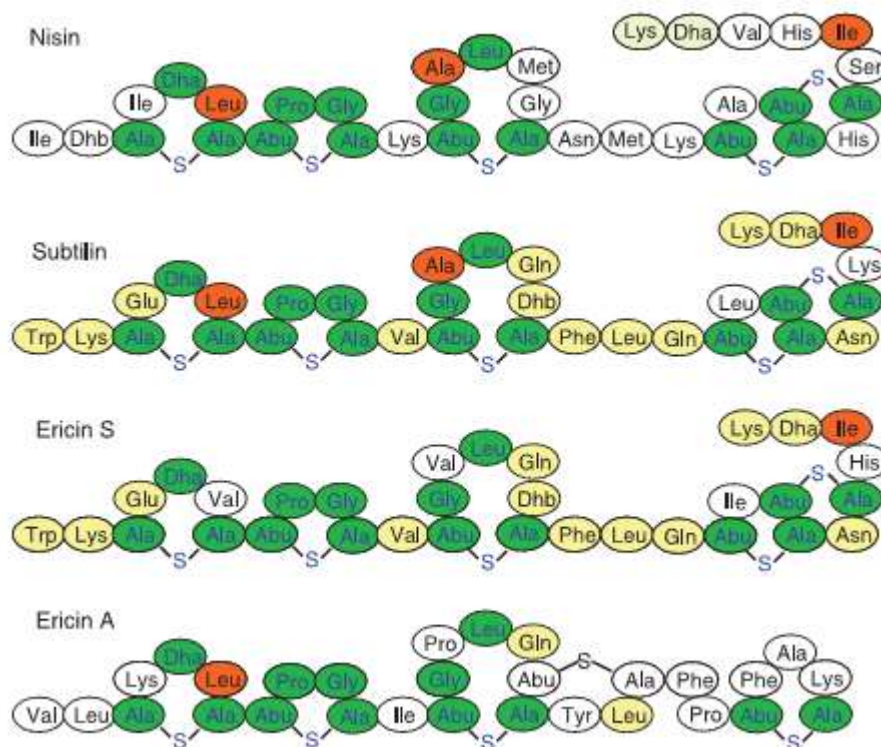
Pode-se exemplificar cada uma das subclasses mencionadas com uma ou mais bacteriocinas já bem conhecidas e caracterizadas.

8.1.1.1) SUBCLASSE I.1:

Pode ser exemplificada pela subtilina, um lantibiótico produzido por *Bacillus subtilis*. A subtilina é um peptídeo antimicrobiano, pentacíclico e catiônico e pertence ao tipo A dos lantibióticos, segundo a classificação geral dos lantibióticos (LEE, 2011). O gene da subtilina codifica um peptídeo precursor de 56 resíduos de aminoácido, posteriormente processado e reduzido a 32 resíduos. Esse precursor contém serina, treonina e cisteína em posições específicas que permitem uma série de reações de desidratação e ligações cruzadas, resultando no peptídeo final, a subtilina.

Os níveis de produção de subtilina aumentam consideravelmente em condições de desnutrição, levando a crer que a função deste peptídeo é o de aumentar o fluxo de nutrientes através da eliminação de espécies competidoras. A subtilina age através da formação de poros na membrana celular, usando a parede celular como ancoragem e é ativa em concentrações nanomolares (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011; LEE, 2011).

A ericina S e a ericina A (Figura 6) são lantibióticos produzidos por *Bacillus subtilis* A 1/3 e possuem similaridades com a subtilina, sendo ativas contra uma série de bactérias, incluindo o agente causador de cancro no tomate, a *Clavibacter michiganensis* (ABRIOUEL et al.2010; STEIN et al., 2002). Assim com a subtilina, as ericinas S e A também apresentam um peptídeo precursor que, após modificações enzimáticas, resulta na molécula de lantibiótico final. Ainda que esses peptídeos, as ericinas S e A, sejam muito similares, seus precursores apresentam, somente, 75% de identidade (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011) (Figura 6).



Verde: resíduos conservados nas quatro estruturas. **Amarelo:** resíduos conservados apenas na subtilina e ericinas S e/ou A. **Vermelho:** outros resíduos conservados (Adaptado de ABRIQUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Figura 6: Comparação entre as estruturas da Nisina (Nisin), Subtilina (subtilin), Ericina S (Ericin S) e Ericina A (Ericin A)

A ericina S é muito similar à subtilina, diferenciando-se apenas por quatro resíduos de aminoácidos, o que resulta em alta similaridade entre as atividades antimicrobianas e propriedades físico-químicas de ambas as moléculas. Já a ericina A apresenta estrutura diferente e a sequência de aminoácidos diferencia-se por 16 aminoácidos, resultando em atividade antimicrobiana menor e propriedades físico-químicas diferentes (STEIN et al., 2002).

8.1.1.2) SUBCLASSE 1.2:

A paenibacilina é um lantibiótico produzido por *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF que, por sua vez, também é produtor de polymyxina, um outro peptídeo antimicrobiano, e possui um amplo espectro de ação contra bactérias patogênicas encontradas em alimentos e bactérias responsáveis pela deterioração de alimentos,

tais como *Clostridium sporogenes* e *Lactobacillus lactis*; é estável em uma ampla faixa de temperatura, resistindo até mesmo à breves períodos em autoclave, e em uma faixa de pH que vai de 2,0 a 9,0 (HE, KISLA, et al., 2007).

A sublancina 168 pertence à subclasse I.2 e é um antibiótico produzido por *Bacillus subtilis* 168. Outras bactérias Gram-positivas são seus principais alvos, incluindo-se alguns patógenos importantes, tais como *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* (PAIK e CHAKICHERLA, 1998).

Mersacidina, produzida por *Bacillus subtilis* HILY-85,54728, é um peptídeo tetracíclico de 1824 Da. Contém quatro anéis intramoleculares: dois separados e região N-terminal e dois entrelaçados na região C-terminal. É ativo contra estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e vancomicina e seu modo de ação consiste em inibir a síntese de parede celular (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

8.1.1.3) SUBCLASSE I.3:

A subclasse I.3 é composta de antibióticos formados por dois peptídeos que atuam em sinergia. Haloduracina e lichenidicina são dois antibióticos produzidos por *Bacillus* e guardam muitas semelhanças com outros produzidos por diferentes tipos de bactérias, tais como: lacticina 3147, produzida por *Lactobacillus lactis* DPC3147, estafilococcina C55, produzida por *Staphylococcus aureus* C55, entre outros (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Haloduracina, produzida por *Bacillus halodurans* C-125, é formada por dois peptídeos modificados após a tradução, Hal α /A1 e Hal β /A2, que agem em sinergia. Possui atividade bactericida contra uma série de bactérias Gram-positivas, entre as quais bactérias dos gêneros: *Listeria*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Pediococcus*. Seu modo de ação consiste em ancorar-se na membrana plasmática e criar poros na mesma, modo este muito similar ao apresentado pela lacticina 3147 (RYAN et al., 1996). Sua estabilidade em pH fisiológico é interessante para estudo de aplicações médicas.

Outra bacteriocina pertencente à esta subclasse é lichenidicina, um antibiótico formado por dois peptídeos, produzida por *Bacillus licheniformis* DMS 13. Possui um alto grau de homologia com haloduracina. A subunidade A da lichenidicina possui alto grau de homologia com a mersacidina. Exibe atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina. (DISCHINGER, JOSTEN, et al., 2009)

8.1.1.4) SUBCLASSE I.4:

A subtilosina A é um peptídeo cíclico, aniônico, sintetizado por via ribossomal e altamente modificado após a tradução. É produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e outras estirpes de *Bacillus subtilis*, além de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus atrophaeus* (STEIN, DÜSTERHUS e STROH, 2004; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

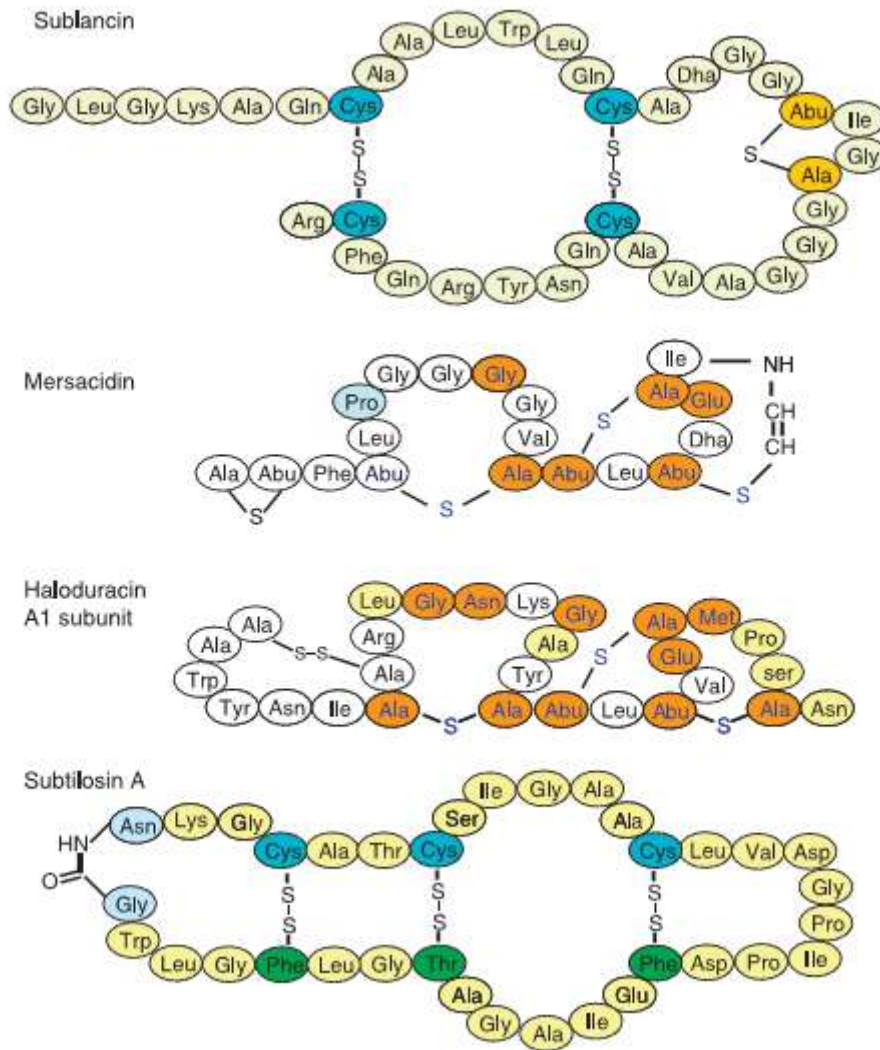
Possui massa molar de 3,4 kDa e resiste bem a condições adversas de temperatura e pH. É capaz de manter totalmente sua atividade, mesmo após uma hora de aquecimento a 100°C ou em uma faixa de pH de 2 -10. Sua atividade bactericida foi demonstrada para *L. monocytogenes* e isolados clínicos de *Gardnerella vaginalis*, além de bactérias Gram-negativas. Ademais, possui atividade espermicida comprovada para bovinos, cavalos, ratos, humanos (STEIN, DÜSTERHUS e STROH, 2004; SUTYAK, ANDERSON, et al., 2008).

Subtilosina A1 é uma variante da subtilosina A, produzida por um mutante de *B. subtilis*, com ação hemolítica. De massa molar de 3412,5 Da, além da atividade hemolítica, possui atividade bactericida contra *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus carnosus* e *L. monocytogenes* (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

8.1.2) CLASSE II:

A classe II inclui peptídeos de 0,77 – 10k Da, lineares, apresentam boa estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, sintetizados por via ribossomal. Subdivide em três subclasses: II.1, II.2 e II.3. A subclasse II.1 é composta por peptídeos do tipo pediocina com uma “sequência-motivo” YGNGVXC em sua região N-terminal; a coagulina produzida por *Bacillus coagulans* e bacteriocinas produzidas por algumas estirpes de *Bacillus circulans* e *Paenibacillus polymyxa*. Na subclasse II.2 estão incluídos peptídeos do tipo turicina, tais como bacturicina F4 e turicina H, enquanto a subclasse II.3 inclui outros peptídeos lineares, como a lichenina e cereinas 7A e 7B (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

As estruturas das bacteriocinas Sublancina, Mersacidina, Haloduracina e Subtilosina A estão ilustradas na Figura 7.



De cima para baixo: sublancina, mersacidina, haloduracina subunidade A1 e Subtilosina A. Ao se comparar as estruturas da mersacidina com haloduracina, nota-se a conservação de resíduos (Laranja). Em azul claro são os resíduos envolvidos na formação de ligações amida responsáveis por “fecharem” a sequência, da subtilosina A sua estrutura circular. Em verde, temos as ligações de enxofre com carbonos- α e, finalmente, em azul escuro temos as cisteínas envolvidas em pontes de dissulfeto (adaptado de ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Figura 7: Ilustração das estruturas de quatro bacteriocinas.

8.1.2.1) SUBCLASSE II.1:

Bacteriocinas do tipo pediocina são aquelas pertencentes à classe II.a pela classificação baseada em BAL. São catiônicas, apresentam atividade anti-*Listeria* e têm como modo de ação a permeabilização da membrana celular. Contêm de 37 a 48 resíduos de aminoácidos e estruturas primárias similares. Não obstante às similaridades de suas sequências de aminoácidos, a especificidade de célula-alvo varia muito de um peptídeo para outro. Esta última característica as torna modelos de

estudo adequados para a análise da relação entre estrutura e especificidade de célula-alvo (JOHNSEN e FIMLAND, 2005).

Coagulina é um peptídeo do tipo pediocina. Possui massa molar de 4,6 kDa, é termoestável e sensível à protease. O gene estrutural da coagulina codifica um peptídeo de 44 aminoácidos similar à pediocina PA-1/AcH. A única diferença entre ambos é o resíduo de aminoácido da posição 41 que na pediocina é uma asparagina, enquanto na coagulina é uma treonina (LE MARREC et al., 2000).

8.1.2.2) SUBCLASSE II.2:

Bacteriocinas desta subclasse apresentam como principal característica uma sequência-consenso N-terminal DWTXWSXL. Estão incluídos muitos peptídeos produzidos por *B. thuringiensis* e a cereína MRX1, produzida por *Bacillus cereus* (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

A thuricina 17 (*thurin 17*) é produzida pelo *Bacillus thuringiensis* NEB17, uma rizobactéria promotora do crescimento de plantas, isolada de raízes de soja. É ativa contra *B. thuringiensis* e *B. cereus*, além de outras espécies do gênero. Diferentemente da maior parte das bacteriocinas produzidas por Gram-positivas, esta apresenta atividade contra *E. coli* MM294 (pBS42). Sua massa molar é de 3,16 kDa, é sensível à protease, termoestável (100°C por 15 min) e resiste a uma faixa de pH que varia de 1,5 a 9,0 (GRAY, LEE, et al., 2006; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

A sequência N-terminal da thuricina 17 é compartilhada por outras bacteriocinas: *thuricin H*, *thuricin S*, *bacthuricin F4* e cereína. A *thuricin H* é produzida por *Bacillus thuringiensis* SF361, uma bactéria isolada de mel. É ativa contra uma série de bactérias Gram-positivas, incluindo-se *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Sua sequência N-terminal é idêntica em 14 aminoácidos à da thuricina 17, com apenas 4 aminoácidos não identificados (LEE e CHUREY, 2009).

A *bacthuricin F4* é um peptídeo de cerca de 3,0 kDa, produzido por *B. thuringiensis* SSP. *Kurstaki* BUPM4 isolado de lixo na Tunísia. Assim como as outras bacteriocinas citadas nesta subclasse, possui uma sequência N-terminal característica (DWTXWSXL). É termoestável, ainda que não resista à autoclave, e resistente em meio ácido (até pH 3) e possui atividade comprovada contra algumas espécies de *Bacillus* (JUNG, MABOOD, et al., 2008).

Um estudo (KAMOUN, MEJDOUB, et al., 2005), comparando *bacthuricin F4* com thuricina 17, demonstrou que ambas apresentam características similares quando se considera a inativação por aquecimento sob pressão, estabilidade durante a

estocagem e tempo de retenção em ensaios de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Demonstraram, também, espectros de ação similares e suas estirpes produtoras demonstraram resistência cruzada. Tudo isso sugere grandes similaridades estruturais (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

8.1.2.3) SUBCLASSE II.3:

Duas bacteriocinas pertencentes a esta subclasse são produzidas, simultaneamente, pelo mesmo microrganismo, *Bacillus cereus*: cereína 7A e cereína 7B. Podem ser distinguidas pelas suas sequências N-terminal, GWGDVL (7A) e GWWNSWGH (7B), respectivamente (OSCÁRIZ, CINTAS, et al., 2006). Cereína 7A, primeiramente denominada cereína7, é um peptídeo linear de cerca de 3,94 kDa de massa molar e com amplo espectro de ação (inibição do crescimento) contra bactérias Gram-positivas. A cereína 7B possui massa molar de cerca de 4,98 kDa e ponto isoelétrico de 8,38. (OSCÁRIZ e LASA, 1999; OSCÁRIZ, CINTAS, et al., 2006).

Produzida por *B. licheniformis* 26L-10/3RA, um microrganismos isolado do rúmen de búfalo-asiático, a lichenina é uma bacteriocina hidrofóbica, pH estável e termoestável, suportando temperaturas de até 100°C por 10 minutos e uma faixa de pH 4,0 -9,0. É produzida sob condições anaeróbias e sua atividade antimicrobiana foi observada apenas em condições anaeróbias. Seu massa molar estimada é de 1344Da. (PATTNAIK, KAUSHIK e GROVER, 2001)

8.1.3) CLASSE III:

Inclui bacteriocinas de massa molar mais alta (>30 kDa), tais como megacina A-216, um peptídeo de 293 resíduos de aminoácidos e massa molar de 66 kDa produzida por *Bacillus megaterium* 216; e megacina A-19213, produzida por *B. megaterium* ATCC 19213. Ambas apresentam atividade de fosfolipase A2, envolvidas na conversão de fosfolipídios em lisofosfolipídios correspondentes. Seus genes estruturais e de imunidade podem ser encontrados em plasmídeos (pBM309 e pBM113, respectivamente). É possível induzir a produção de megacina A-216 por meio de luz UV, N-nitro-N-nitrosoguanidina ou mitomicina. A síntese de megacina leva à lise celular em um período de 2h a 3h. O sobrenadante livre de células é capaz de matar células sensíveis, mesmo em diluições de 10^{-4} e a estirpe produtora apresenta imunidade. Como é característico de muitas bacteriocinas, apresenta um espectro de ação relativamente estreito, sendo ativa contra algumas estirpes de *B. subtilis*, *B.*

anthracis, *Micrococcus aurantiacus* e *M. cinnabareus* (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011; KISS, BALIKÓ, et al., 2008).

Muitas outras substâncias antimicrobianas ainda não completamente caracterizadas são conhecidas como *bacteriocin-like inhibitory substances* (BLIS) ou substâncias inibidoras similares à bacteriocinas. Este termo é utilizado, principalmente, quando a natureza peptídica da substância ainda não foi totalmente confirmada. No caso de substâncias produzidas por *Bacillus*, torna-se fundamental comprovar também a síntese por via ribossomal, pois o grupo é reconhecido por produzir peptídeos antimicrobianos por vias diversas à ribossomal (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

A proposta de nova classificação para bacteriocinas produzidas por *Bacillus* e a comparação com a classificação baseada em BAL encontra-se no quadro 4, abaixo:

Quadro 4: Classificação proposta para bacteriocinas de *Bacillus* e comparação com BAL:

Classificação proposta:	Exemplos	Bacteriocinas de BAL
Classe I: Peptídeos com modificações pós-traducionais		Classe I: lantibióticos
Subclasse I.1: lantibióticos alongados, peptídeo único	Subtilina Ericina S	
Subclasse I.2: outros lantibióticos de peptídeo único	Sublancina 168 Penibacilina	
Subclasse I.3: lantibióticos de dois peptídeos	Haloduracina	
Subclasse I.4: peptídeos com outras modificações pós-traducionais	Subtilosina A	
Classe II: Peptídeos não-modificados		Classe II
Subclasse II.1: peptídeos do tipo pediocina	Coagulina	Subclasse IIa
Subclasse II.2: peptídeos do tipo thuricina	Thuricinas H, S e 17	
Subclasse II.3: outro peptídeos lineares	Cereina 7A e 7B	
Classe III: proteínas grandes	Megacina A-216	Classe III

Fonte: adaptado de ABRIOUEL, FRANZ e OMAR (2011).

8.2) BLIS PRODUZIDAS POR *BACILLUS*:

Uma BLIS produzida *Bacillus amyloliquifaciens* LBM 5006, microrganismo isolado da mata atlântica brasileira, despertou interesse ao demonstrar atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e responsáveis pela deterioração de alimentos, tais como, *B.cereus*, *Serratia marcescens* e *Pasteurella haemolytica*. Suporta temperaturas de até 80°C por 30 minutos, com atividade máxima observada em uma faixa de pH de 3,0 – 8,0. Demonstrou sensibilidade à tripsina, papaína, proteinase K e pronase E (LISBOA, BONATTO, et al., 2006).

Muitas BLIS são produzidas por *Bacillus cereus*. Estas BLIS são conhecidas como cereínas, tal como cereína 8A, uma BLIS produzida por *B. cereus*8A, cereína GN105, produzida por *B. cereus*GN105, entre outras (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Cereína 8A é de particular interesse devido a sua atividade contra bactérias patogênicas e responsáveis pela deterioração de alimentos. Apesar de não demonstrar atividade bactericida contra *E. coli* e *Salmonella enteritidis*, demonstrou ser capaz de inibir o crescimento das mesmas. A eficiência desta inibição aumenta quando se adiciona agentes quelantes, tais como EDTA, em um efeito similar ao observado em outra bacteriocina de interesse: a nisina.

Assim como a nisina, o efeito inibidor da cereína 8A leva ao enfraquecimento da membrana celular, seguido do sequestro de íons magnésio por parte do agente quelante. É sensível à protease e mantém sua atividade mesmo em altas temperaturas, perdendo sua atividade somente em temperaturas maiores que 75°C após 30 minutos (BIZANI, MOTTA, et al., 2005; BIZANI, 2005).

Produzida por *B. licheniformis* 490/5, um microrganismo isolado de laticínios, a bacilocina 490 é um peptídeo de 2 kDa, pH estável e termoestável. Possui atividade bactericida contra espécies relacionadas, tais como outras estirpes de *B. licheniformis* e *B.cereus*, em condições aeróbicas e anaeróbicas. Entretanto, há outras BLIS de interesse produzidas por *B. licheniformis*, pois apresentam atividade antifúngica, além da atividade antibacteriana. Estirpes como *B. licheniformis* ZJU12, *B. licheniformis* MKU3e *B. Licheniformis* A12, já foram identificadas como produtoras de tais substâncias (GÁLVEZ, MAQUEDA, et al., 1993).

Bacillus subtilis e *B. thuringiensis* também já foram caracterizados como produtores de BLIS com atividades antibacterianas e antifúngicas. *Bacillus subtilis* MJP1, isolado de sementes de soja fermentadas, produz uma BLIS com atividade antimicrobiana contra espécies de bactérias de Gram-positivas, leveduras e fungos filamentosos, muitos desses sendo microrganismos responsáveis pela deterioração de

alimentos. *Bacillus thuringiensis* subespécie *entomocidus* HD9 produz entomocina 9, BLIS ativa contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

9) IDENTIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTERIOCINAS:

Muitas são as substâncias de interesse produzidas por microrganismos. Destacam-se os antibióticos, as enzimas, as vitaminas, entre outras. Entretanto, muito antes que se possa produzir em larga escala, uma série de etapas científicas e tecnológicas deve ser cumprida. Desde o mais básico, a descoberta e isolamento do microrganismo produtor, até testes avançados de eficiência terapêutica e toxicidade, no caso de moléculas de interesse para saúde humana e animal (TEO, 2006).

No caso de bacteriocinas não é diferente. O processo começa com o *screening* e isolamento de microrganismos produtores, seguido de caracterização e purificação do peptídeo, um processo longo que envolve a determinação do espectro de ação, do modo de ação, análise de estabilidade, cinética de ação e genética de síntese e imunidade. Os trabalhos de Duarte (2010); He e Chen (2006); Teo (2006) e Pattnaik, Kaushik e Grover (2001) são exemplares nesse sentido.

Muito antes de qualquer tipo de teste de produção é preciso identificar e selecionar microrganismos produtores. Alguns trabalhos realizam *screenings* de amostras coletadas no ambiente, em busca de novos microrganismos produtores e novas moléculas (OSCÁRIZ e LASA, 1999; GÁLVEZ, MAQUEDA, et al., 1993) e da microbiota de animais, em busca de microrganismos e moléculas que possam ser utilizados tratamentos veterinários ou em humanos, na esperança de que, uma vez que tal microrganismos já faz parte da microbiota, ele seja inofensivo (PATTNAIK, KAUSHIK e GROVER, 2001), *screening* realizado através de testes de atividade antimicrobiana contra estirpes indicadoras, buscando moléculas e microrganismos ativos contra estirpes específicas cujo controle se faz necessário. Os trabalhos de Tagg (1971) e Kékessy (1970) são fundamentais nesse aspecto e servem de base para testes até hoje.

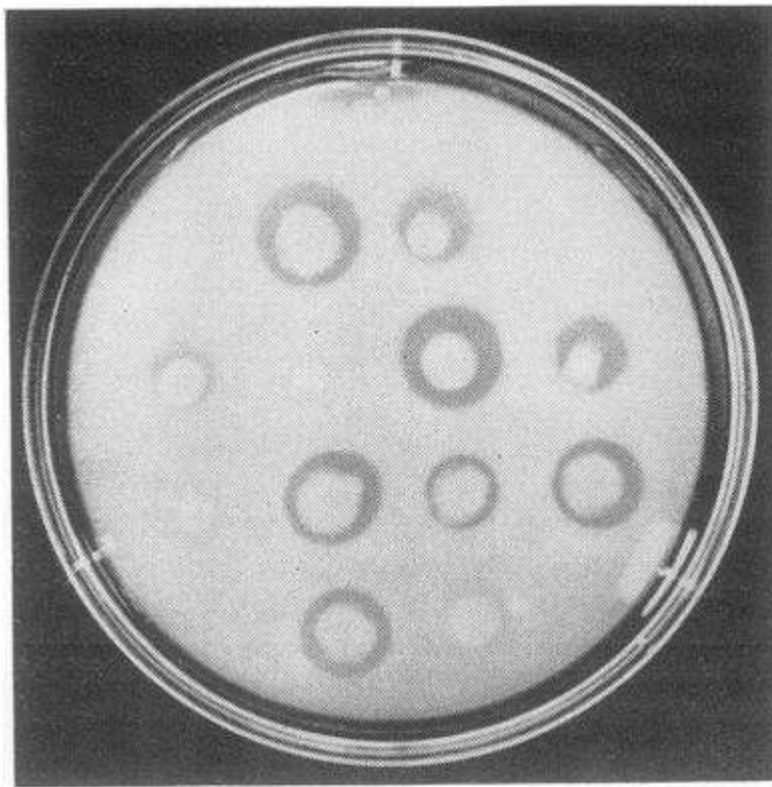
Seleção do microrganismo:

Em Kekessy (1970) está descrito um método baseado no fato da difusão de bacteriocinas em meio sólido ocorrer tridimensionalmente. Após o isolamento de colônias da estirpe produtora, esta é cultivada na superfície do meio sólido adequado. Após o período necessário para crescimento, o ágar é solto da placa de Petri. Essencialmente, utiliza-se uma espátula estéril para soltar as bordas do ágar e inverte-se a placa, de modo que o que antes era a superfície do ágar agora se encontra na tampa da placa e a antiga base do ágar é a nova superfície. Em seguida, a estirpe indicadora é inoculada na nova superfície e, após incubação, a produção de bacteriocinas pode ser detectada pela presença, ou não, de halos de inibição.

Tagg (1971) descreve uma técnica similar e, de fato, baseada na técnica apresentada por Kèkessy (1970), apesar de conter diferenças fundamentais. Nesta técnica, primeiro cultiva-se, em meio líquido, a estirpe cuja atividade deseja-se testar. Espera-se que esse meio possua o peptídeo com atividade antimicrobiana. Removem-se as células e estoca-se o material. Em uma placa de Petri adiciona-se meio de cultura sólido específico para estirpe indicadora. Nesse meio sólido, com o uso de um perfurador, abrem-se pequenos poços cujas bases são preenchidas novamente com meio de cultura. Em seguida, adicionam-se aos poços quantidades iguais do meio líquido cuja atividade deseja-se testar. Após o tempo necessário para difusão, inverte-se a placa da forma descrita em Kèkessy (1970) e inocula-se a nova superfície do meio com cultura contendo a estirpe indicadora em fase exponencial. A atividade pode ser determinada pela presença de halos de inibição.

Em outro método, descrito em Duarte (2010) e Giambiagi-Demarval, Mafrae Penido (1990), a estirpe produtora é inoculada em meio apropriado sob a forma de pontos. Após a incubação, as células são mortas por exposição a vapores de clorofórmios por 30 minutos. Em seguida, a cultura indicadora, pré-incubada em meio semi-sólido, é vertida sobre a placa de Petri. A determinação de atividade antimicrobiana é observada pela presença de halos de inibição.

Tais ensaios são utilizados também na determinação do espectro de ação. De fato, quando se realiza um ensaio de atividade antimicrobiana, testa-se a atividade antimicrobiana contra um organismo em particular. Quando se utiliza mais de um microrganismo indicador, podemos determinar um espectro de ação. Quais microrganismos serão testados dependerá do interesse e da estirpe produtora. Trabalhos como o de He e Chen (2006) realizaram tais testes contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos.



Neste caso, utilizou-se 12 estirpes diferentes de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de piocinas contra um único microrganismo sensível. Notam-se os halos de inibição. (Adaptado de KÉKESSY, 1970).

Figura 8: Exemplo de ensaio para seleção de microrganismo.

Sensibilidade e estabilidade:

A análise de estabilidade e sensibilidade frente enzimas, pH, temperatura e detergentes é fundamental para caracterização do agente antimicrobiano em questão. Os resultados desses testes indicam se a atividade antimicrobiana se deve a um peptídeo ou não, ainda que isso não seja suficiente para se afirmar que se trata de uma bacteriocina (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Os ensaios de estabilidade se dão da mesma forma que os ensaios de atividade já descritos. Entretanto, os sobrenadantes a serem testados sofrem um pré-tratamento específico para cada teste. Os pré-tratamentos enzimáticos mais comuns são aqueles realizados com proteases, tais como tripsina, proteinase K, pronase E, pepsina, entre outras (NAGHMOUCHI, PATERSON, et al., 2011).

Os efeitos de pH e temperatura também são testados de maneira a determinar uma faixa em que a atividade se mantenha e em que momento esta começa a

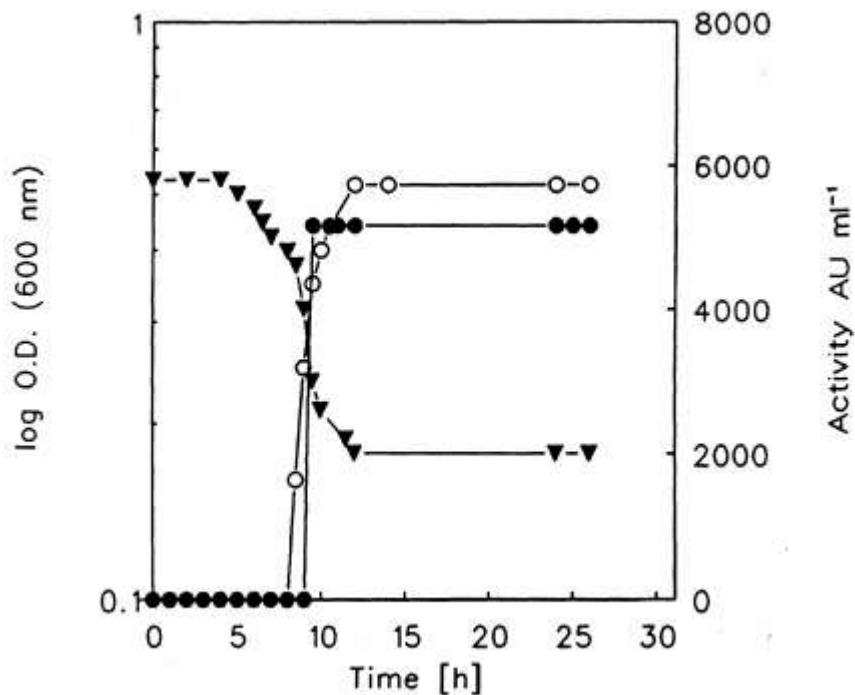
diminuir. Para tanto, ajusta-se o pH do sobrenadante ou aquece-se o mesmo por um determinado tempo e, em seguida, testa-se a atividade frente uma estirpe indicadora. O ajuste de pH também permite eliminar os efeitos de ácidos orgânicos produzidos por microrganismos e que, também, possuem efeito antimicrobiano (HE e CHEN, 2006; IVANOVA, MITEVA, et al., 1998; DUARTE, 2010; NAGHMOUCHI, PATERSON, et al., 2011).

É fundamental que os testes de sensibilidade e estabilidade sejam realizados em dois momentos: no sobrenadante sem purificação, de forma a reconhecer se a atividade antimicrobiana pode ser devida a um peptídeo e, posteriormente, quando a substância já tiver sido purificada, de forma a testar, de fato, a sensibilidade e estabilidade desta substância frente esses agentes, conforme demonstrado em Motta e Cladera-Oliveira (2004) e Motta, Cannavane Tsai (2007).

Purificação:

Bacteriocinas são proteínas secretadas para o meio extracelular e, portanto, estratégias de purificação de proteínas são as utilizadas quando se deseja purificá-las; tendo como primeiros passos a obtenção, separação da biomassa e concentração do sobrenadante livre de células (CINTAS, CASAUS e NES, 2001). Ainda segundo Cintas, Casaus e Nes (2001), recomenda-se que primeiro otimize-se a produção de bacteriocinas, pois a produção das mesmas depende do estágio de crescimento e, portanto, conhecer bem a cinética de produção permite que se obtenha uma maior quantidade da substância de interesse.

Para se determinar a cinética de produção de uma determinada bacteriocina, em geral, constrói-se uma curva de crescimento e atividade simultâneas. Para tanto, cultiva-se a estirpe produtora em meio líquido adequado. Em intervalos de tempo regulares (que variam de microrganismo para microrganismo) retira-se alíquotas do meio de cultivo. Nesta alíquota são realizados os ensaios de crescimento bacterianos, através de ensaios de densidade celular e, após centrifugação da amostra para separação da biomassa e recuperação do sobrenadante, é testado para atividade microbiana (descrito no item seguinte). Os resultados são plotados simultaneamente em um gráfico para análise (Figura 9). Tal procedimento pode ser observado em Ivanova et al. (1998) Pattnaik, Kaushik e Grover (2001) e Xiraphiet al. (2008).



As mudanças na densidade celular são (-o-), atividade antimicrobiana (-•) e pH (triângulo). (adaptado de IVANOVA, MITEVA, *et al.*, 1998). O título designado como unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UAm1-1) foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição.

Figura 9: Exemplo de uma curva de produção de bacteriocina e crescimento bacteriano.

Algumas bacteriocinas, em seus estados nativos, formam agregados de alta massa molar (30-300 kDa). Estes agregados podem mascarar ou, até mesmo, anular a atividade antimicrobiana dessas bacteriocinas e induzir a erros na determinação da massa molecular. Isso é ainda mais crítico para bacteriocinas apolares de baixo peso molecular, que interagem fortemente com material de lise (resquícios da membrana celular, por exemplo) e outros compostos apolares do meio. Esses complexos podem ser desagregados através do uso de agentes como uréia e dodecil sulfato de sódio (CINTAS, CASAUS e NES, 2001).

São três, os métodos mais comuns de concentração de proteínas utilizados em bacteriocinas:

- i) Filtração por diálise
- ii) Precipitação por sais, tais como sulfato de amônio
- iii) Precipitação por solventes orgânicos

Ainda que este passo seja necessário para a recuperação das bacteriocinas, este não é seletivo. É necessário, portanto, a utilização de outros métodos para a separação do composto de interesse dos outros compostos proteicos da amostra (BIZANI, 2005; CINTAS, CASAUS e NES, 2001; NES IF, 2007).

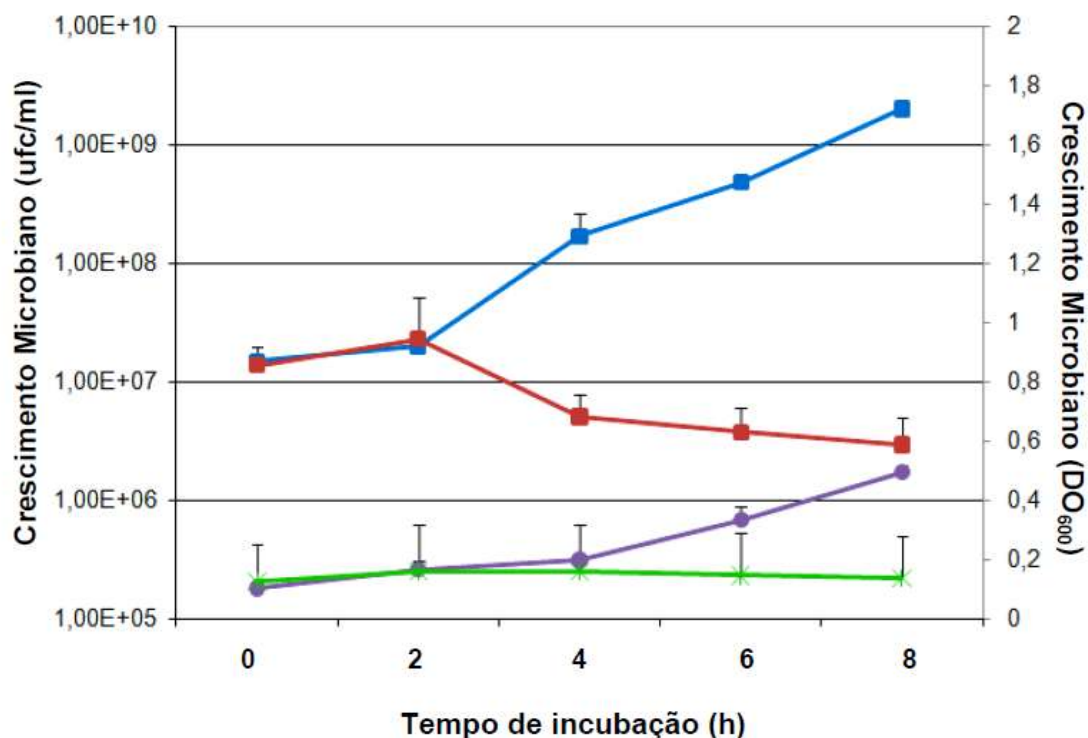
Após a concentração das proteínas, em geral, utiliza-se cromatografia para a separação e purificação posteriores. Ivanova et al.(1998) utilizaram CLAE com uma coluna de TSK 2000 SW e fase móvel água-acetonitrila-metanol-ácido orto-fosfórico (500:1:1:1) para a separação. Importante ressaltar que cada fração foi novamente testada em termos de atividade antimicrobiana, de forma a determinar em qual(is) fração(ões) a concentração de bacteriocina seria maior. Os trabalhos de Bizani (2005) He e Chen (2006), Motta, Cannavan e Tsai (2007), Xiraphi et al.(2008) seguiram o mesmo procedimento, ainda que com condições experimentais diferentes.

Caracterização:

Uma vez purificada a bacteriocina, o passo seguinte é a caracterização da mesma. Neste caso, caracterização significa determinar: i) espectro de ação da bacteriocina purificada; ii)estabilidade da bacteriocina (pH, enzimas, temperatura, solventes orgânicos); iii)análise da cinética de ação; iv) massa molar da proteína e v) sequência de aminoácidos.

- i) O espectro de ação da bacteriocina purificada é determinado da mesma forma que se determinou o espectro de ação para o sobrenadante, a diferença é que neste caso, pode-se determinar a ação da bacteriocina de interesse sem interferências (IVANOVA et al., 1998; ABRIQUEL, FRANZ e OMAR, 2011).
- ii) O teste de estabilidade é realizado da mesma forma que o apresentado anteriormente, mas, assim como no teste de espectro de ação da bacteriocina purificada, aqui também se eliminam possíveis interferências (XIRAPHI, GEORGALAKI, et al., 2008)
- iii) A análise da cinética de ação em Duarte (2010) foi realizada da seguinte forma: uma solução de concentração conhecida da bacteriocina a se caracterizar foi adicionada a culturas de uma espécie indicadora, com a número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml) conhecido. Retirou-se um volume de 200 µL de cultura com bacteriocina e incubou-se por 8h. A cada duas horas, fazia-se a análise da densidade ótica (DO) de cada uma das amostras. Após as oito horas,

foi feita nova leitura da UFC/ml. Os resultados estão apresentados abaixo:



Em vermelho (•), contagem de células em na presença de SAM4244; azul (•), contagem de células em UFC/ml na ausência de SAM 4244; verde (•) e (•) DO na presença de SAM 4244

Figura 10: Cinética de ação da SAM 4244 contra estirpe indicadora *L monocytogenes* ATC19117. (ADAPTADO DE DUARTE, 2010)

A análise dos resultados, segundo Duarte (2010), mostra que a bacteriocina em questão foi capaz de reduzir o crescimento da estirpe indicadora em, aproximadamente, três unidades log, após 8h de cultivo. Paralelamente, verifica-se que a DO para a cultura com adição da bacteriocina manteve-se estável em 0,1. Tal resultado, indica que o tipo de ação da bacteriocina é ação bacteriostática e não bacteriolítica.

Análise desse tipo são essências na caracterização da bacteriocina, não apenas por nos dizerem o quão rapidamente tal substância age, mas, também, por nos indicar qual o tipo de ação da mesma: se não-bactericida ou bacteriolítico.

- iv) A determinação da massa molar da sequência de aminoácidos de uma bacteriocina pode ser feita através dos mesmos métodos utilizados para outros tipos de proteínas. Entre os mais utilizados está a espectrometria

de massa(KAMOUN, MEJDOUB, etal ; BONELLI e WIEDEMANN, 2006; CINTAS, CASAUS e NES, 2001; HE e CHEN, 2006)

Por fim, há de se determinar a via de síntese, pois, para ser definido como bacteriocina, um peptídeo antimicrobiano deve ser sintetizado por via ribossomal. É essencial caracterizar a organização genética e os genes estruturais (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Genética:

Exemplar no sentido de caracterização genética de um peptídeo antimicrobiano é o trabalho de Ceotto (2009) que, como parte de seu trabalho, identificou o gene estrutural e analisou a organização genética da simulancina 3299, um peptídeo antimicrobiano produzido por *Staphylococcus simulans* 3299.

A análise dos sete primeiros aminoácidos presentes no peptídeo (simulancina 3299) revelou identidade com a nukacina ISK-1, um lantibiótico produzido por *Staphylococcus warneri* ISK-1. Essa busca por similaridades com proteínas já conhecidas e caracterizadas é fundamental, pois ajuda a direcionar o estudo da proteína de interesse. Uma vez detectada tal similaridade, Ceotto utilizou a sequência do gene estrutural da nukacina ISK-1 depositada no “GenBank” para desenhar oligonucleotídeos iniciadores a serem utilizados em Reação da Polimerase em Cadeia (PCR, em inglês) para detectar o gene estrutural no DNA genômico da estirpe produtora estudada.

O fragmento obtido foi amplificado e sequenciado, revelando uma sequência idêntica ao gene estrutural da nukacina ISK-1, o que levou à conclusão que a simulancina3299 e a nukacina ISK-1 são codificadas por genes estruturais idênticos e que, portanto, a simulancina 3299 é um lantibiótico de 27 ácidos aminados do subtipo All, pertencendo à família da lacticina 481 (CEOTTO, 2009). A localização dos genes de produção da simulancina 3299 também foi realizado e demonstrou que os determinantes genéticos relacionados à produção da simulancina 3299 estão localizados no plasmídeo pRJ97. Além disso, ficou demonstrado a organização em *operon* dos genes envolvidos na biossíntese de simulancina 3299. Em todos os casos, o uso da sequência já conhecida para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

A presença dos genes estruturais e de síntese das proteínas a serem caracterizadas nos permite afirmar com segurança que trata-se de uma bacteriocina. Em alguns casos, como o citado acima, nos permite até mesmo encontrar

similaridades com outras bacteriocinas conhecidas e classificar a bacteriocina estudada. O estudo de uma bacteriocina, entretanto, não termina uma vez que se determina sua organização genética. Pode-se ainda determinar o mecanismo de ação, o passo a passo da síntese, a estrutura tridimensional, ou seja, a caracterização de uma bacteriocina é um processo longo e complexo, mas os passos apresentados aqui são suficiente para se determinar a natureza proteica, o espectro de ação, a sensibilidade e a via de síntese, permitindo classificar como bacteriocina (CINTAS, CASAUS e NES, 2001; CASCALES, BUCHANAN, et al., 2007; BIERBAUM, 2009; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

10) APLICAÇÕES:

10.1) APLICAÇÕES EM MEDICINA:

O aumento da resistência bacteriana aos antibióticos conhecidos, aumenta o interesse pela busca de novos antimicrobianos a serem utilizados em tratamentos de infecções em seres humanos e animais (LAWTON e ROSS R.P. E COTTER, 2007)

Resistência cruzada entre bacteriocinas e antibióticos convencionais de uso clínico raramente é observada. Isto se deve ao fato de os dois grupos possuírem modos de ação diferentes e com receptores celulares diferentes. Já foi relatado que bacteriocinas tanto de *Bacillus*, *Staphylococcus*, quanto de algumas bactérias lácticas possuem atividade contra patógenos e têm potencial para serem aplicadas no tratamento de infecções humanas e animais (OMAN, 2009; DUARTE, 2010; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011). O quadro (5) mostra algumas bacteriocinas e seus espectros de ação contra patógenos e potenciais aplicações.

Subtilosina A é de particular interesse devido à sua atividade contra patógenos vaginais em geral resistentes à terapia convencional com antibióticos, tais como *Gardnerella vaginalis*, além de apresentar atividade antifúngica e espermicida, sendo esta uma característica que lhe fornece potencial para aplicações como contraceptivo (SUTYAK, ANDERSON, et al., 2008; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Além de ser um biopreservativo de alimentos, a nisina pode ser aplicada no tratamento de diferentes infecções, como as causadas por *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, podendo ser aplicada no tratamento de mastite bovina. A atividade da estafilococcina C55 contra *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae*

sugere potencial aplicação no tratamento de meningite e gonorréia, respectivamente (COELHO, NASCIMENTO, et al., 2007; COLLINS, COTTER e HILL, 2010; DUARTE, 2010).

Quadro4– Bacteriocinas e potenciais aplicações em tratamento de infecções:

Bacteriocinas:	Bactéria produtora	Patógenos:	Referência:
Aureocina A53	<i>S. aureus</i> A53	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. agalactiae</i> <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Moraxellabovis</i>	(DUARTE, 2010; FAGUNDES, 2008; COELHO, NASCIMENTO, et al., 2007)
Aureocina A70	<i>S. aureus</i> A70	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>S. agalactiae</i> <i>Corynebacterium</i> spp.	(DUARTE, 2010; FAGUNDES, 2008; COELHO, NASCIMENTO, et al., 2007)
Estafilococcina C55	<i>Staphylococcus</i> <i>warneri</i> SK-1	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	(DUARTE, 2010; FAGUNDES, 2008; COELHO, NASCIMENTO, et al., 2007)
Haloduracina	<i>B. halodurans</i> C-125	MRSA e VRE	(OMAN, 2009)
Nisina	<i>Lactococcus</i> <i>laticis</i>	<i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i> <i>S. aureus</i> (mastite bovina)	(THOMAS, 2005)
Subtilosina A	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633 <i>B. amyloliquefaciens</i> <i>B. atrophaeus</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>G. vaginalis</i> <i>S. agalactiae</i> Atividade espermicida	(SUTYAK, ANDERSON, et al., 2008)

10.2) APLICAÇÕES COMO BIOPRESERVATIVOS DE ALIMENTOS:

A deterioração de alimentos depende de muitos fatores: composição dos alimentos, armazenamento, tipo de processamento, entre outros. A principal causa é a microbiológica, um problema grave, não apenas do ponto de vista econômico, mas, também, sanitário. Entretanto, o debate acerca do melhor método de preservação dos

alimentos está longe do fim. Se por um lado existe a necessidade de se prolongar a vida de prateleira dos alimentos, assim como de produção de alimentos seguros, por outro se tem a demanda por alimentos menos processados, com menos conservantes e cada vez mais naturais (GALVEZ, ABRIOUEL e LÓPEZ, 2007).

Há potencial para aplicação de bacteriocinas em alimentos. De fato, há muitos anos são consumidas devido à produção por bactérias lácticas durante a fermentação do alimento. Esse potencial se deve, principalmente, ao fato de serem substâncias GRAS, por serem inativadas no sistema digestivo e por sua alta especificidade, o que as torna atóxicas para células eucarióticas. Também contribuem, a termo estabilidade geralmente apresentada e a ampla faixa de pH em que se mantém ativas (GALVEZ, ABRIOUEL e LÓPEZ, 2007).

Há muitas formas de se utilizar bacteriocinas como preservativos de alimentos: i) adição de bacteriocinas como aditivos de alimentos, método no qual a bacteriocina é produzida, purificada e depois adicionada ao produto alimentício final; ii) adição de culturas bacteriocinogênicas a alimentos, método no qual adiciona-se culturas de microrganismos produtores da bacteriocina de interesse e permite-se a produção in situ de bacteriocina; iii) adição de bacteriocinas combinadas a alimentos, em que duas ou mais bacteriocinas são adicionadas ao alimento, de modo que a ação combinada obtenha resultados melhores que os seria possíveis com apenas uma; iv) aplicação de bacteriocinas adsorvidas em embalagens ativas de alimentos e v) adição de bacteriocinas em conjunto com outros tratamentos (DUARTE, 2010).

A utilização de bacteriocinas como aditivo é mais bem exemplificada pela nisina (Nisaplin®), um composto sólido, composto por 2,5% de nisina A e 97,5% de sólidos derivados de leite fermentado por estirpe produtora de nisina A (*L. lactis*), utilizada na prevenção da deterioração e aumento de vida de prateleira de muitos alimentos, como laticínios e, recentemente, estudos sugeriram a sua utilização na preservação de ovos (COLLINS, COTTER e HIIL, 2010; DELVES-BROUGHTON, 2007).

A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (OAA/OMS) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/kg de peso corpóreo. Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis. No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg e nosso país é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos

cárneos, sendo permitida sua utilização na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução de ácido fosfórico grau alimentício(SCHULZ, PEREIRA, et al., 2003)

Foi demonstrado que bacilocina 490 é ativa contra muitas espécies de *Bacillus*, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas, e mantém sua atividade bactericida em amplas faixas de pH e temperatura, sugerindo sua utilização como aditivo durante o processamento de alimentos sob elevadas temperaturas (ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011).

Bizani, Morrissy Dominguez (2008) avaliaram o uso de cereína 8A, produzida por *Bacillus cereus*, como aditivo para preservação de laticínios e verificaram que ao se adicionar a mesma ao leite UHT, reduz-se o número de células viáveis de *L. monocytogenes* em três unidades log por 14 dias a 4°C e, ao se realizar o mesmo teste em queijos, a redução foi de 2 unidades log por 30 dias a 4°C.

A utilização de microrganismos na preservação de alimentos não é nenhuma novidade. De fato, a fermentação é a mais antiga técnica de preservação de alimentos e é utilizada até hoje. Durante a fermentação diversos metabólitos são produzidos. Alguns destes, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, atuam como preservativos (O'SULLIVAN e ROSS, 2002).

Oguntoyinbo, Sannie Franz(2007) e Oguntoyinbo et al.(2010)investigaram a inibição de *B. cereus* em um condimento nigeriano para sopas, *okpehe*, valendo-se de uma estirpe de *B.subtilis* produtora de subtilisina. Os estudos demonstraram que *B.subtilis* BFF 5031, quando utilizada como cultura iniciadora, foi capaz de inibir completamente o crescimento de *B. cereus* produtor de toxinas.

O uso de duas ou mais bacteriocinas, ao mesmo tempo, como preservativo de alimentos tem a vantagem da ação combinada que apresentam, tendo sido observado o aumento da atividade antimicrobiana e ação em uma faixa maior de condições do meio, ou seja, um tipo de bacteriocina pode continuar agindo em condições nas quais os outros tipos já não agem mais. Além disso, tem-se como vantagens a possível diminuição das doses utilizadas e dificultar o surgimento de bactérias resistentes (GALVEZ, ABRIOUEL e LÓPEZ, 2007).

As combinações pediocina AcH e nisina, nisina e leuconocina F10, lacticinas B ou F e nisina e, por fim, lacticina 481 e pediocina AcH, foram testadas e comparadas com a atividade antimicrobiana apresentada por cada uma das bacteriocinas individualmente e, constatou-se que a ação conjunta das mesmas era sempre maior

que a individual (GALVEZ, ABRIOUEL e LÓPEZ, 2007). A ação conjunta de nisina e pediocina também se mostrou eficaz contra os esporos de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, duas espécies problemáticas para as indústrias de cogumelos e mariscos (OGUNTOYINBO, HUCH, et al., 2010).

Embalagens ativas de alimentos são embalagens que atuam tanto na proteção do produto do ambiente, quanto na extensão da vida de prateleira e manutenção de sua inocuidade. A embalagem antimicrobiana é um tipo de embalagem que atua inibindo, reduzindo ou retardando o crescimento de microrganismos. Existem três categorias principais de filmes antimicrobianos para embalagens: 1) incorporação das substâncias antimicrobianas em sachês conectados à embalagem, dos quais a substância bioativa é liberada durante o armazenamento; 2) incorporação direta do agente antimicrobiano ao filme; e 3) incorporação do agente antimicrobiano ao revestimento da embalagem que atua como sua carreadora. (FAGUNDES, 2008).

Santiago-Silva et al. (2009) desenvolveram e analisaram a atividade antimicrobiana de um filme de celulose contendo pediocina comercializada (ALTA® 2351) contra *L. innocua* e *Salmonella* spp. em presunto fatiado. A redução de duas unidades log das células viáveis de *L. innocua* quando comparada ao controle sem bacteriocina, após 15 dias de armazenamento a uma temperatura de 12°C, foi obtida ao se utilizar uma embalagem com 50% de pediocina.

Em outro estudo, também com o objetivo de preservação de presunto fatiado, Marcose et al. (2007) verificaram que ao utilizarem embalagens contendo enterocinas imobilizadas em filmes de alginato, puderam controlar o crescimento de *L. monocytogenes* por oito dias a uma temperatura de 6°C.

Assim como a combinação de diversas bacteriocinas pode aumentar a eficiência de controle e diminuir a dose necessária, a combinação de bacteriocinas com outros métodos de controle microbiano pode obter o mesmo efeito. Muitas bacteriocinas, por exemplo, tem sua atividade e eficiência aumentadas quando utilizadas em conjunto com agentes quelantes, tais como ETDA. Isso se dá pois estes agentes atuam sequestrando íon Ca^{+2} e Mg^{+2} da membrana plasmática, especialmente de bactérias Gram-negativas, desestabilizando-as. Cereina 8A, por exemplo, quando combinada com EDTA tem sua eficiência muito aumentada na inibição de *Salmonella* Enteritidis (GALVEZ, ABRIOUEL e LÓPEZ, 2007; LAPPE, MOTTA e SANT'ANNA, 2009).

Há estudos que mostram a combinação promissora de bacteriocinas com outros métodos, tais como associação com ácidos orgânicos (UHART e RAVISHANKAR, 2004), nitritos (GALVEZ, ABRIOUEL e LÓPEZ, 2007), tratamento térmico e campo elétrico pulsado (NAIM, ZAREIFARD, et al., 2008). Campo elétrico pulsado (CEP) é um processo no qual aplica-se pulsos elétricos de alta voltagem, causando grande desestruturação da membrana, causando inativação microbiana. Como a maioria das bacteriocinas atua diretamente na membrana, uma desestruturação na mesma tende a aumentar o efeito bactericida das mesmas.

A enterocina AS-48 foi estudada em combinação com CEP contra *Lactobacillus dilivorans* 29. Foi determinado que mesmo uma concentração subinibitória da bacteriocina possuía alta atividade bactericida, quando combinada com CEP (GALVEZ, ABRIOUEL e LÓPEZ, 2007; VIEDMA, ABRIOUEL, et al., 2009).

11) CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Microrganismos fazem parte da vida humana. Não apenas habitam nossos corpos, mas, também, estão presentes em todas as nossas criações e, em muitos casos, são o “reator” necessário para que possamos criar algo. Microrganismos já faziam parte de nossas criações mesmo quando ainda não éramos capazes de discernir tal fato como, por exemplo, no fabrico de cerveja e pães. Entretanto, não é apenas em processos fermentativos que nos valemos de microrganismos, em muitos outros casos essa convivência nos é benéfica.

Microrganismos possuem um arsenal vasto de defesa com diversos mecanismos, valendo-se desde antibióticos, metabólitos secundários, toxinas e bacteriocinas. Este arsenal existe para proteção individual e vantagem evolutiva na concorrência contra outras espécies de microrganismos (RILEY, 2002). Característica esta que pode, deve e é explorada por seres humanos no controle de microrganismos indesejáveis, muitas vezes patogênicos.

Dentre esses mecanismos as bacteriocinas despontam como armas promissoras, pois foram encontradas em todas as espécies de *Bacteria* examinadas até o momento, inclusive em algumas espécies estudadas de *Archaea* (SHAND, 2007; ABRIOUEL, FRANZ e OMAR, 2011). Esta diversidade e ubiquidade, combinadas com o desenvolvimento de resistência a antibióticos de amplo espectro clássicos por parte de bactérias, despertam o interesse sobre o assunto.

A preocupação com a preservação de alimentos, com a busca de novos métodos de preservação que levem a gradual redução ou, até mesmo, a eliminação do uso de aditivos, também desperta interesse no assunto bacteriocinas. O foco tem sido as bactérias lácticas, cujos processos de fermentação normal produzem metabólitos como ácidos orgânicos, peróxidos de hidrogênio e bacteriocinas, protegendo o alimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. De fato, há muito a nisina, sob a forma de Nisaplin®, é utilizada na preservação de laticínios.

Estudos recentes mostram que a tendência é a descoberta e caracterização de novas bacteriocinas e que aumente a utilização das mesmas na conservação de alimentos, principalmente, tanto sob a forma de peptídeos livres, quanto produzidas in situ, através da adição de bactérias produtoras. Entretanto, ainda que se possa dizer que esta seja a tendência, não se pode dizer que a exploração comercial das bacteriocinas sob a forma de peptídeos livres tenha, de fato, aumentado, apesar de muitas novas bacteriocinas tenham sido descobertas e caracterizadas.

Essa estagnação comercial pode ser devida a problemas de regulação, pois para que uma substância seja utilizada como aditivo, alguns princípios gerais devem ser respeitados: 1) avaliação das suas propriedades toxicológicas, 2) somente aditivos considerados seguros podem ser liberados para uso em alimentos, 3) os aditivos devem ser novamente avaliados caso surjam novas informações sobre sua segurança e uso, 4) essas substâncias devem manter-se em conformidade com as especificações do *Codex Alimentarius Commission*, 5) a justificativa para uso de aditivos deve ser baseada em requisitos de segurança alimentar para diferentes tipos de consumidores e 6) a aprovação temporária ou permanente do uso dos aditivos alimentares deve considerar a limitação para alimentos específicos, seu objetivo, condições de uso, descrição das quantidades necessárias para que os efeitos desejados sejam atingidos e o nível de tolerância aceitável para consumidores em geral (FAGUNDES, 2008).

Assim, a adição de culturas de bactérias GRAS e produtoras de bacteriocinas parece mais promissora em curto prazo, pois, uma vez consideradas GRAS, uma série de entraves legislativos pode ser contornado e, além disso, a adição dessas bactérias é mais barato do que produzir, purificar e inocular bacteriocinas livres.

Surge a questão de por que o esforço para a purificação de bacteriocinas para fins de biopreservação de alimentos. A resposta para esta questão não é única. Ainda que haja uma série de barreiras legais a serem superadas, bacteriocinas podem ser utilizadas em conjunto com outros métodos de preservação com mais facilidade que

bactérias vivas, especialmente altas temperaturas e agentes atuantes nas membranas celulares, como EDTA. Além disso, bacteriocinas purificadas podem ser utilizadas em metodologias inviáveis para bactérias vivas como, por exemplo, o método de embalagens ativas.

O rápido desenvolvimento de patógenos bacterianos multi-resistentes tem despertado o interesse para novos métodos terapêuticos. O amplo espectro de ação de alguns antibióticos lhes dá um efeito bactericida sobre um número muito grande de espécies bacterianas e seu uso excessivo resulta em forte pressão para seleção de espécies resistentes. O relativo estreito espectro de ação das bacteriocinas sugere sua utilização como alternativa terapêutica. O estreito espectro de atividade direciona a ação sobre microrganismos patogênicos de interesse, com reduzido efeito sobre outras espécies, reduzindo a pressão sobre desenvolvimento de resistência (RILEY, 2002).

Entretanto, este potencial ainda é relativamente pouco explorado, principalmente quando comparado a biopreservação de alimentos. A maior parte dos estudos ainda se encontra em nível inicial, com testes de atividade contra patógenos, ainda distantes de se alcançar o estágio de estudos clínicos, necessários para liberação de qualquer terapia. Este estágio inicial observado no estudo de aplicações terapêuticas pode estar relacionado com o fato de o conhecimento sobre bacteriocinas de outros tipos bacterianos, como as do gênero *Bacillus*, ainda não terem se equiparado aos de BAL, o tipo mais estudado.

Segundo ABRIOUEL, FRANZ e OMAR(2011), apesar de todo o conhecimento já disponível sobre a produção de bacteriocinas por bacilli, a literatura científica ainda está repleta de outras substâncias antimicrobianas de natureza protéica, muitas delas caracterizadas de forma incompleta, sem informações sobre sua via de síntese e erroneamente denominadas bacteriocinas.

A caracterização ao nível genético é fundamental, não apenas para que se possa definir uma substância como bacteriocina, mas para que se possa estudar a relação e similaridades com outras bacteriocinas já conhecidas. Esforços neste sentido são, certamente, necessários.

Apesar de já se conhecer a existência de bacteriocinas há muito tempo, o conhecimento sobre este tipo de substância ainda é pequeno, especialmente quando comparado com outros tipos de substâncias antimicrobianas. Principalmente no que diz respeito às bacteriocinas de bactérias não lácticas, há ainda muito que se

descobrir e prova disso é a nova proposta de classificação que separa bacteriocinas de *Bacillus* da classificação de BAL. De fato, mesmo a classificação de bacteriocinas de BAL ainda não é consenso entre cientistas.

Espera-se que o estudo das bacteriocinas tenha entrado em um caminho sem volta e que cada vez mais substâncias sejam caracterizadas, pois apresentam grande potencial em muitas áreas importantes, tanto social quanto economicamente. Por fim, mas nem por isso menos importante, são os estudos relacionados à função que as bacteriocinas possuem na natureza. A compreensão profunda de suas atividades contra outras bactérias podem elucidar relações evolutivas, desde como uma bactéria se mostra mais bem adaptada que outra, até como uma espécie elimina a outra na corrida pela sobrevivência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M. A. P.; OMAR, N. B. & G. A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, 35, 2 August 2011. 201-232.

ALLISON, G. E.; WOROBO, R. W.; STILES, M. E. & K. T. R. Heterologous Expression of the Lactacin F Peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 1995. 1371 - 1377.

BANNERMAN, T. L. E. P. S. J. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci. In: MURRAY, P. R., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th. ed. [S.I.]: ASM Press, 2007. p. 390-411.

BASTOS, M. C. F.; CEOTTO, H.; COELHO, M. L. V. A. N. J. S. Staphylococcal Antimicrobial Peptides: Relevant Properties and Potential Biotechnological Applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 10, 2009. 38-61.

BIERBAUM, G. & S. H.-G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 10, 2009. 2-18.

BIERBAUM, G. et al. The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7. **Antonie van Leeuwenhoek**, 69, 1996. 119-127.

BIZANI, D. D. A. P. M. E. B. A. Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. **Letters in Applied Microbiology**, 41, 2005. 269 - 273.

BIZANI, D. et al. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. **International Microbiology**, 8, 2005. 125 - 131.

BIZANI, D.; MORRISSY, J. A.; DOMINGUEZ, A. P. & B. A. Inhibition of *Listeria monocytogens* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. **Int. J. Food. Microbiol.**, 121, 2008. 229-233.

BONELLI, R. R.; WIEDEMANN, I. & S. H.-G. Lantibiotics. In: _____ **Handbook of Biologically Active Peptides**. [S.I.]: Elsevier, 2006. Cap. 16, p. 97-105.

CASCALES, E. et al. Colicin Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, March 2007. 158-229.

CASCALES, E. et al. Colicin Biology. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, March 2007. 158-229, Vol 71, No 1.

CEOTTO, H. **Caracterização de peptídeos antimicrobianos com potencial de aplicação biotecnológica, produzidos por *Staphylococcus* spp.** [S.I.]: [s.n.], 2009.

CHATTERJEE, S. et al. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. **The Journal of Antibiotics**, 45, June 1992. 832 - 839.

CHAVAN, M. A. & R. M. A. Molecular Evolution of Bacteriocins in Gram-Negative Bacteria. In: CHAVAN, M. A. & R. M. A. **Bacteriocins: ecology and evolution**. [S.l.]: Springer, 2007. p. 19 - 44.

CINTAS, L. M.; CASAUS, M. P.; NES, I. F. & H. P. E. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Science and Technology International**, 7, 2001. 281-305.

COELHO, M. L. V. et al. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. **Research in Microbiology**, 158, 2007. 625-630.

COLLINS, B.; COTTER, P. D.; HILL, C. & R. R. P. Applications of Lactic Acid Bacteria-Produced Bacteriocins. In: MOZZI, F.; RAYA, R. R. & V. G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2010. p. 89 -110.

COTTER, P. D.; HILL, C. & R. R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, 3, October 2005. 777 - 788.

DELVES-BROUGHTON. Use of Nisaplin® as a preservative in pasteurised liquid egg products, 2007. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/use-nisaplin-preservative-pasteurised-t822/p0.htm>>. Acesso em: 30 jan 2012.

DISCHINGER, J. et al. Production of the novel two-peptide lantibiotic lichenidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. **PLoS One**, 4, 26 agosto

DUARTE, A. F. S. **Caracterização da SAM 4244, um peptídeo bioativo com potencial aplicação como um biopreservativo de alimentos**. [S.l.]: 2010. 116f. Dissertação de Mestrado em Ciências - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010., 2010.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K. & I. A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, 24, 21 Outubro 2000. 855 -106.

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 10 Janeiro 2012. (A)

EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/bacillus.html>>. Acesso em: 10 Janeiro 2012. (B)

FAGUNDES, P. C. Análise da produção das aureocinas A70 e A53 para uso em alimentos e caracterização da Bac 3682. **2008. 119f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.**

FONTANA, M. B. C.; DE BASTOS, M. C. F. E. B. A. Bacteriocins Pep5 and Epidermin Inhibit *Staphylococcus epidermidis* Adhesion to Catheters. **Current Microbiology**, 52, 2006. 350-353.

GÁLVEZ, A. et al. Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 39, 1993. 438-442.

GALVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R. L. & O. N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **Int. J. Food Microbiol.**, 120, 2007. 51-70.

GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; MAFRA, M. A.; PENIDO, E. G. C. E. B. M. C. F. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, 136, 1990. 1591 - 1599.

GRAY, E. J. et al. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. **Journal of Applied Microbiology**, 100, 2006. 545-554.

HE, L.; CHEN, W. E. L. Y. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. **Microbiological Research**, 161, 2006. 321 - 326.

HE, Z. et al. Isolation and identification of *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, Janeiro 2007. 168 - 178.

HECHT, O. et al. Characterisation of the interaction of colicin A with its co-receptor TolA. **FEBS Letters**, 584, 2010. 2249-2252.

HEIDRICH, C. et al. Isolation, Characterization and Heterologous Expression of the Novel Lantibiotic Epicidin 280 and Analysis of its Biosynthetic Gene Cluster. **Applied and Environmental Microbiology**, 64, September 1998. 3140-3146.

HENG, N. C. K. et al. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: RILEY, M. A. & C. A. **Bacteriocins: Ecology and Evolution**. [S.l.]: Springer, 2007. p. 45 -92.

HOOVER, D. G. & C. H. Bacteriocins with potential for Use in Foods. In: DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N. & B. A. L. **Antimicrobials in Food**. 3ª. ed. [S.l.]: Taylor & Francis , 2005. Cap. 13, p. 389 -429.

IVANOVA, I. et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. **International Journal of Food Microbiology**, 42, 1998. 147 - 158.

JACK, R. W.; TAGG, J. R. & R. B. Bacteriocins of Gram-Positive Bacterias. **Microbiological Reviews** , Rio de Janeiro, Junho 1995. 171-200.

JOHNSEN, L.; FIMLAND, G. E. N.-M. J. The C-terminal Domain of Pediocin-like Antimicrobial Peptides (Class IIa Bacteriocins) Is Involved in Specific Recognition of the C-terminal Part of Cognate Immunity Proteins and in Determining the Antimicrobial Spectrum. **The Journal of Biological Chemistry**, 280, 11 Março 2005. 9243-9250.

JOZALA, A. F. Produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo. **2005. 93f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2005.**

JUNG, W.-J. et al. Stability and Antibacterial Activity of Bacteriocins Produced by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 18, 4 Junho 2008. 1836 - 1840.

KAMOUN, F. et al. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, 98, 2005. 881 - 888.

KÉKESSY, D. A. E. P. J. D. New Method for Detecting Bacteriocin Production. **Applied Microbiology**, 20, August 1970. 282 - 283.

KISS, A. et al. Cloning and Characterization of the DNA Region Responsible for Megacin A-216 Production in *Bacillus megaterium* 216. **Journal of Bacteriology**, 190, Outubro 2008. 6448-6547.

LANCASTER, L. E.; WINTERMEYER, W. & R. M. V. Colicins and their potential in cancer treatment. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, Volume 38, Issue 1, January - February 2007. 15 - 18.

LAPPE, R.; MOTTA, A. S.; SANT'ANNA, V. & B. A. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by cerein 8A, EDTA e sodium lactate. **International Journal Food Microbiology**, 135, 2009. 312-316.

LAWTON, E. M.; ROSS R.P. E COTTER, P. D. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 7, 2007. 1236-1247.

LE MARREC, C. et al. Biochemical and Genetic Characterization of Coagunli, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins, Produced by *Bacillus coagulans* I4. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, Dezembro 2000. 5213 - 5220.

LEE, H. & K. H.-Y. Lantibiotics, Class I bacteriocins from the Genus *Bacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21, 15 Fevereiro 2011. 229 - 235.

LEE, H.; CHUREY, J. J. E. W. R. W. Biosynthesis and transcriptional analysis of thuricin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. **FEMS Microbiology Letters**, 299, 2009. 205 - 213.

LISBOA, M. P. et al. Characterization of bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. **International Microbiology**, 9, 2006. 111 - 118.

LODEMANN, U.; LORENZ, B. M. . W. K. D. & M. H. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. **Archives of Animal Nutrition**, 62, 2008. 87-106.

MARCISET, O.; JERONIMUS-STRATINGH, M. C.; MOLLET, B. A. P. B. Thermophilin 13, a Nontypical Antilisterial Poration Complex Bacteriocin, That Functions without a Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, 272, 1997. 14277-14284.

MARCOS, B. et al. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. **International Journal of Food Microbiology**, 25, 2007. 177-182.

MAYO, B. et al. Updates in the metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: MOZZI, F.; RAY, R. R. & V. G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 1^a. ed. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 1, p. 3-34.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P. & H. C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiology Reviews**, 25, 5 Dezembro 2000. 285 - 308.

MICHEL, B. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. **PLoS Biol**, 3, 2005.

MOTTA, A. S.; CANNAVAN, F. S.; TSAI, S.-M. & B. A. Characterization of broad range antibacterial substance from a new *Bacillus* species isolated from Amazon basin. **Archives of Microbiology**, 188, 2007. 367-375.

MOTTA, A. S.; CLADERA-OLIVEIRA, F. & B. A. Screening for antimicrobial activity among bacteria isolated from the Amazon basin. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35, 20 Dezembro 2004. 307-310.

NAGHMOUCHI, K. et al. *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications. **Archives of Microbiology**, 193, 2011. 169 - 177.

NAIM, F. et al. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate articles: from kinetics to process validation. **Food Microbiology**, 26, 2008. 491-496.

NES IF, Y. S.-S. & D. D. B. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. **Food Science Biotechnology**, 16, 2007. 675-690.

NETZ, D. J. A. et al. Molecular characterization of aureocin A70, a multipeptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, 311, 2001. 939-949.

NETZ, D. J. A. et al. Biochemical Characterization and Genetic Analysis of Aureocin A53, a New Atypical Bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, 319, 2002. 745-756.

NISSEN-MEYER, J. et al. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 10(1), 2009. 19 - 37.

OGUNTOYINBO, A.; SANNI, A. I.; FRANZ, C. M. A. P. & H. W. H. In vitro fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starters cultures for the

production of okpehe, a traditional African fermented condiment. **International Journal Food Microbiology**, 112, 2007. 208-218.

OGUNTOYINBO, F. A. et al. Diversity of *Bacillus* species isolated from okpehe, a traditional fermented soup condiment from Nigeria. **Journal Food Protection**, 73, 2010. 870-878.

OMAN, T. J. & V. D. D. W. A. Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin. **ACS Chemical Biology**, 4, 2009. 856-874.

OSCÁRIZ, J. C. et al. Purification and sequencing of cerein 7B, a novel bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. **FEMS Microbiology Letters**, 254, 2006. 108-115.

OSCÁRIZ, J. C.; LASA, I. E. P. A. G. Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity. **FEMS Microbiology Letters**, 178, 1999. 337 - 341.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R. P. & H. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, 84, 23 July 2002. 593 - 604.

PAIK, S. H.; CHAKICHERLA, A. E. H. J. N. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, Sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. **The Journal of Biological Chemistry**, 273, 4 Setembro 1998. 23134 - 23142.

PATTNAIK, P.; KAUSHIK, J. K.; GROVER, S. E. B. V. K. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by *Bacillus licheniformis* isolated from water buffalo. **Journal of Applied Microbiology**, 91, 2001. 636 - 645.

RILEY, M. A. & W. J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. **Biochimie**, 2002. 84, 357 - 364.

RILEY, M. A. Molecular Mechanisms of Bacteriocin Evolution. **Annual Reviews Genetics**, 1998. 255-278.

ROGNE, P. et al. Three-Dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. **Peptides**, 16 June 2009. 1613-1621.

SANTIAGO-SILVA, P. et al. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA 2351) on preservation of sliced ham. **Food Control**, 20, 2009. 85-89.

SCHULZ, D. et al. BACTERIOCINAS: MECANISMO DE AÇÃO E USO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS. **Alimentos e Nutrição**, 14, 2003. 229-235.

SHAND, R. F. & L. K. J. Peptide and protein antibiotics from the domain Archaea: halocins and sulfolobocins. In: RILEY, M. A. & C. M. A. **Bacteriocins: ecology and evolution**. New York: Springer, 2007. p. 93-110.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, 56, 2005. 845 - 857.

STEIN, T. et al. Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, 44, Janeiro 2002. 403 - 416.

STEIN, T.; DÜSTERHUS, S.; STROH, A. & E. K.-D. Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. **Applied and environmental microbiology**, 70, abril 2004. 2349-2353.

SUTYAK, K. E. et al. Spermicidal activity of the safe natural antimicrobial peptide subtilosin. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, 2008.

TAGG, J. R. E. M. A. R. Assay System for Bacteriocins. **Applied Microbiology**, 21, May 1971. 943.

TEO, A. Y. L. E. T. H. M. Screening for Microbial Products. In: LEE, K. Y. **Microbial Biotechnology: Principles and Applications**. 2ª Edição. ed. [S.I.]: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, 2006. Cap. 1, p. 3 - 21.

THOMAS, L. V. & D.-B. J. Nisin. In: DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N. & B. A. L. **Antimicrobials in food**. 3ª. ed. [S.I.]: Taylor & Francis, 2005. Cap. 7, p. 237 -275.

UHART, M.; RAVISHANKAR, S. & M. N. D. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials of beef franks stored at 4 degrees Celsius. **Journal of Food Protection**, 67, 2004. 2296-2301.

VÁSQUEZ, S. M.; SÚAREZ, H. & Z. S. Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. **Revista Chilena de Nutrição**, 36, Marzo 2009. 64-71.

VIEDMA, P. M. et al. Effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against the spoilage bacterium *Lactobacillus diolovorans* in apple juice. **Food Microbiology**, 26, 2009. 491-496.

XIRAPHI, N. et al. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, 80, 2008. 194-203.

ANEXO:

- **Antibiótico:** em sentido amplo, antibiótico pode ser considerado uma substância química produzida por um microrganismo e que é capaz de interferir no crescimento de outro microrganismo ou eliminá-lo. Entretanto, usualmente, considera-se antibiótico como os metabólitos secundários que, com base em observações laboratoriais, inibem o crescimento ou eliminam bactérias, mesmo quando em concentrações relativamente baixas. Esta definição exclui subprodutos do metabolismo que também possuem atividade antimicrobiana, tais como amônia, ácidos e peróxidos.
- **Bactericida:** diz-se que uma substância é bactericida quando ela capaz de eliminar (destruir) uma bactéria.
- **Bacteriostático:** diz-se que uma substância é bacteriostático quando ela capaz de inibir ou interromper o crescimento bacteriano.
- **Biopreservação:** biopreservação é o uso de microbiota, natural ou controlada, como meio de preservação de alimentos e aumento da vida de prateleira do mesmo. Culturas bacterianas não patogênicas ou produtos de fermentação bacteriana são utilizados como método de preservação contra a deterioração de alimentos e/ou eliminação de microrganismos nocivos.
- **Catalase-positiva/negativa:** Catalase é uma enzima comum, encontrada em muitos organismos vivos expostos a ambientes com oxigênio. Sua função é catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Catalase positiva é uma espécie que possui a enzima e catalase negativa é a espécie que não produz.
- **Espectro de ação:** é o conjunto de espécies de microrganismos sobre as quais a substância antimicrobiana apresenta atividade. Diz-se que o espectro é estreito quando o número de espécies diferentes é relativamente pequeno, em geral com espécies próximas evolutivamente à espécie produtor e com poucos gêneros diferentes. Espectro amplo significa número relativamente grande de espécies-alvo diferentes, inclusive entre espécies não relacionadas evolutivamente à espécie produtoras, inclusive de gêneros diferentes e, em alguns casos, apresenta atividade contra outros tipos microbianos como, por exemplo, fungos.

- **Gram-negativa/Gram-positiva:** Bactérias Gram-positivas são aquelas que assumem coloração escura (azul ou violeta) quando coradas segundo a técnica de Gram. Isso se dá pois possuem alta concentração de peptídeoglicano em suas paredes celulares, o que leva à retenção do corante cristal violeta. Bactérias Gram-negativas possuem camadas mais finas de peptídeoglicano e, com isso, retêm menos corante.
- **GRAS:** é a sigla para *Generally Recognized as Safe*, uma definição da *American Food and Drug Association (FDA)*, para produtos químicos, bioquímicos e culturas microbiológicas consideradas seguras para serem utilizadas em alimentos como aditivos de preservação, corantes e outras finalidades.
- **Modo de ação:** modo de ação, ou mecanismo de ação, é a rota química ou bioquímica pela qual um agente antimicrobiano atua sobre a célula alvo. No caso de bacteriocinas existem três mecanismos: ação sobre a síntese de parede celular da célula alvo; desequilíbrio iônico da membrana celular ou destruição direta da parede celular.
- **Termoestável/ termolábil:** diz-se que uma molécula é termoestável quando mantém estrutura e atividade aproximadamente constantes, mesmo quando exposta a variações grandes de temperatura, variações bruscas e quando é capaz de resistir a altas temperaturas por períodos prolongados. Ao contrário, considera-se uma molécula termolábil quando tem sua estrutura e atividades comprometidas ao ser exposta a variações de temperatura.