

BACTÉRIAS LÁTICAS COMO PROBIÓTICAS, BIOCONSERVANTES DE ALIMENTOS E PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS: UMA REVISÃO

Lactic bacteria as probiotics, food bio-preservatives and producers of bacteriocins: a review

Marissa Justi Cancelli^{1}, Taline Amorim Santos¹, Elisângela Michele Miguel¹,
Gisela de Magalhães Machado Moreira¹, Denise Sobral¹, Felipe Alves de Almeida²*

RESUMO

A fermentação láctica tem importância desde os primórdios da humanidade na conservação de alimentos, em decorrência da fermentação natural por bactérias lácticas (BAL) autóctones que fazem parte da microbiota natural do alimento. As BAL podem, também, ser intencionalmente adicionadas com intuito de conferir características sensoriais aos alimentos, tais como aroma, sabor e textura, além de características funcionais, com características probióticas, capacidade de reduzir o pH e inibir a multiplicação de microrganismos indesejáveis. As BAL são capazes de produzir vários compostos, tais como ácido láctico, ácido acético, diacetil, peróxido de hidrogênio, enzimas e bacteriocinas que desempenham várias atividades, dentre elas, a de bioconservação que é desejável aos alimentos, uma vez que substitui a adição de substância conservadoras e aditivos aos produtos. Estas características das BAL vão de encontro à demanda do mercado consumidor por alimentos com alegações funcionais, mais naturais e com adição de uma quantidade menor de ingredientes. Diante do exposto, esta revisão bibliográfica tem como objetivo mostrar as aplicações de BAL como probióticas, produtoras de bacteriocinas e bioconservantes de alimentos, bem como apontar os desafios para estudos futuros. Em alimentos, algumas estirpes de BAL são reconhecidas e autorizadas pelos órgãos oficiais competentes como probióticas e podem ser adicionadas aos alimentos. Dentre as bacteriocinas produzidas por BAL, a nisina é autorizada e comercializada em diversos países e destaca-se por sua ação contra

1 Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Rua Tenente Luís de Freitas, 116, Santa Terezinha, 36045-560, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: marissajc@hotmail.com

2 Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia Agrícola, Viçosa, MG, Brasil.

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 30/06/2023

Aprovado / Approved: 07/02/2024

microrganismos patogênicos. Muitos estudos avaliam a ação probiótica de várias estirpes de BAL isoladas de alimentos e mostram seu potencial probiótico, bem como a produção de bacteriocinas e atividade antimicrobiana in vitro contra patógenos e deterioradores. Entretanto, ainda são necessárias pesquisas para identificar novas BAL e seus metabólitos, bem como avaliar sua segurança e resistência às condições do trato gastrointestinal, identificar os mecanismos da ação, avaliar as propriedades tecnológicas e determinar os protocolos para a sua aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: antimicrobiana; bacteriocinogênica; biopreservação; bioproteção.

ABSTRACT

Lactic acid fermentation is an important technique used in food preservation, resulting from natural fermentation by indigenous lactic acid bacteria (LAB) that are part of the natural microbiota of the food. LAB can also be intentionally added to foods to impart intrinsic sensory characteristics, such as aroma, flavor, and texture, as well as functional, probiotic characteristics, the ability to reduce pH, and inhibit the multiplication of undesirable microorganisms. LAB can produce several compounds, such as lactic acid, acetic acid, diacetyl, hydrogen peroxide, enzymes and bacteriocins that perform several activities, including biopreservation, which is desirable for foods, as it replaces the addition of preservative substances and additives to products. These characteristics of BAL meet the consumer market's demand for foods with functional claims, more natural and with the addition of a smaller amount of ingredients. Given the above, this literature review aims to show the applications of LAB as probiotics, producers of bacteriocins and food biopreservatives, and to point out the challenges for future studies. In foods, some LAB strains are recognized and authorized by official regulatory organizations as probiotics and can be added to foods. Among the bacteriocins produced by BAL, nisin is authorized and marketed in different countries and stands out for its action against pathogenic microorganisms. Many studies evaluate the probiotic activity of various LAB strains isolated from foods and show their probiotic potential, as well as the production of bacteriocins and in vitro antimicrobial activity against pathogens and spoilage agents. However, research is still needed to identify new LAB and their metabolites, evaluate their safety and resistance to gastrointestinal tract conditions, identify the mechanisms of action, evaluate the technological properties and determine protocols for their application in the food industry.

Keywords: antimicrobial; bacteriocinogenic; biopreservation; bioprotection.

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, os microrganismos são utilizados para a produção e a conservação de alimentos e bebidas. Há evidências da produção de coalhada e queijo entre 7000 A.C. e 6500 A.C., com a domesticação de animais e o consumo de leite de origem animal. O armazenamento do leite em potes cerâmicos propiciava condições para a coagulação espontânea, dando, assim, início aos primeiros produtos lácteos fermentados, desenvolvidos e descritos, posteriormente, pelas culturas gregas e romanas (KINDS-TEDT, 2012). No ano de 1857, Louis Pasteur descreveu a fermentação láctica como um fenômeno

em que um fermento láctico, até então desconhecido, era capaz de transformar o açúcar presente no substrato em ácido láctico (PASTEUR, 1857). Em 1878, Joseph Lister descreveu uma metodologia para o isolamento da primeira cultura láctica denominada *Bacterium lactis*, observando que esse único microrganismo era o responsável pela fermentação láctica, conferindo a acidificação e a coagulação do leite (LISTER, 1878). Desde a descoberta das bactérias lácticas (BAL), muitos estudos foram e ainda são desenvolvidos nas áreas de alimentos, biológica, química e médica, buscando a identificação de suas propriedades e aplicabilidades tanto para o desenvolvimento de produtos como para a saúde dos seres humanos e animais.

As BAL são Gram-positivas, apresentam-se na forma de cocos ou bastonetes, não são esporuladas, são mesofílicas ou termofílicas e podem ser microaerófilas, anaeróbias facultativas ou anaeróbias. Em relação à fermentação e à produção de metabólitos, podem ser homofermentativas as quais produzem apenas ácido láctico ou heterofermentativas, produzindo ácido láctico e outros compostos. As BAL estão presentes em diversos alimentos como vegetais, frutas, produtos cárneos fermentados, bebidas fermentadas, produtos em conserva, leite e derivados, além de serem encontradas em cavidades do corpo de seres humanos e de animais como boca, genitais, intestino e trato respiratório (DOSTA *et al.*, 2009; KÖNIG; FRÖHLICH, 2017; TIAN, 2019). Esses microrganismos são fastidiosos, ou seja, são muito exigentes nutricionalmente e necessitam de diversos fatores para a sua multiplicação, como a presença de micronutrientes, carboidratos solúveis, peptídeos e aminoácidos resultantes da degradação de proteínas, além de baixa tensão de oxigênio, devido à condição da sua respiração celular. Por isso, as BAL estão presentes em alimentos ricos em nutrientes, tais como produtos lácteos e, para o seu cultivo *in vitro* são utilizados, comumente, os meios de cultura De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e M17 (DOSTA *et al.*, 2009; FREIRE *et al.*, 2021; TREJO-GONZÁLEZ *et al.*, 2022).

Os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) permitem a adição de BAL em alguns produtos lácteos, sendo que elas podem conferir as características sensoriais, reológicas, físico-químicas e microbiológicas destes produtos. Como acontece na elaboração e na maturação de queijos, as BAL, em decorrência de seu metabolismo, conferem características sensoriais e podem produzir compostos bioativos, como exopolissacarídeos (EPS), peptídeos, ácidos graxos, ácidos orgânicos, vitaminas, bacteriocinas, ácido gama butírico (GABA) e aminas biogênicas (LÓPEZ-MENDOZA *et al.*, 2023). Para leites fermentados como o iogurte, a coalhada e o kefir, a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 traz como ingrediente obrigatório cultivos

de BAL e/ou cultivos de BAL específicas. Além disso, determina a contagem mínima de BAL presente em cada produto (BRASIL, 2007).

As BAL possuem classificação polifásica baseada nos seus fenótipos e genótipos, sendo divididas em vários gêneros, tais como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, entre outros (WRIGHT; AXELSSON, 2019). A partir do estudo de Zheng *et al.* (2020) houve a reclassificação do gênero *Lactobacillus* com base na análise filogenética, sendo este dividido em 25 gêneros: *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* e *Secundilactobacillus*.

Dentre estes gêneros, algumas espécies de BAL apresentam destaque na indústria de alimentos, sendo as mais utilizadas para fermentação de lácteos as descritas na Tabela 1 (MÄYRA-MÄKINEN; BIGRET, 2004; ZHENG *et al.*, 2020). Estas espécies destacam-se por conferir características sensoriais aos alimentos, tais como aroma, sabor e textura. Além disso, uma característica relevante é que podem ser probióticas, ou seja, um potencial funcional, além de apresentarem capacidade de reduzir o pH e inibir os microrganismos indesejáveis que possam estar presentes nos alimentos. As BAL são capazes de produzir vários compostos como ácido láctico, ácido acético, diacetil, peróxido de hidrogênio, enzimas e bacteriocinas, que desempenham várias atividades, dentre elas a de bioconservação (SIAMANSOURI *et al.*, 2013).

Diante do exposto, esta revisão bibliográfica tem como objetivo mostrar as aplicações de Bactérias lácticas como probióticas, produtoras de bacteriocinas e bioconservantes de alimentos, bem como apontar os desafios para estudos futuros.

Tabela 1. Espécies de BAL mais utilizadas para fermentação de lácteos

Nomenclatura antiga	Nomenclatura atual
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i>
<i>Leuconostoc cremoris</i>	<i>Leuconostoc cremoris</i>
<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>

BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS

De acordo com a definição da *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), “Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, (ISAPP, 2019). Além disso, os microrganismos probióticos devem ser reconhecidos como geralmente seguros ou *Generally Recognized as Safe* (GRAS), devem resistir ao ácido gástrico e sais biliares, não possuir propriedades patogênicas e devem colonizar temporariamente o trato intestinal (GÁMEZ *et al.*, 2023; ISAPP, 2019). Em geral, os probióticos podem ser consumidos por meio de formulações farmacêuticas e por meio do consumo de alimentos fermentados, como produtos lácteos tipo iogurtes, queijos, kefir, entre outros.

As BAL probióticas podem estar naturalmente presentes ou podem ser adicionadas intencionalmente aos alimentos, conferindo efeitos benéficos à saúde do consumidor, tais como: impactar positivamente na microbiota intestinal; aumentar a digestibilidade de carboidratos complexos e proteínas; estimular a função intestinal; estimular o sistema imunológico, aumentando a resistência a infecções; possuir potencial papel anti-inflamatório; e ter associação com o controle de peso. Estes efeitos se dão por meio dos pro-

cessos fermentativos através das vias de fermentação homoláctica, heteroláctica, maloláctica e/ou do ácido cítrico, bem como pela produção de ácidos, peptídeos bioativos, vitaminas, compostos antioxidantes e EPS (ILSI BRASIL, 2022; LEEUWENDAAL *et al.*, 2022).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 241, de 27 de julho de 2018 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe sobre o uso de probióticos em alimentos. Dentre os requisitos a serem avaliados estão a comprovação de sua segurança, de efeito benéfico à saúde e a identificação do microrganismo (BRASIL, 2018). Os probióticos mais utilizados e disponíveis atualmente para o uso humano, principalmente em alimentos pertencem ao grupo das BAL, tais como as do antigo gênero *Lactobacillus*.

Segundo a IN nº 76, de 5 de novembro de 2020 da ANVISA, são permitidas as seguintes BAL como constituinte alimentar: *L. acidophilus* NCFM (ATCC SD5221), *Lactobacillus gasseri* BNR17 (KCTC 10902BP), *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (ATCC SD5675), *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *L. rhamnosus* GG (DSM 33156), *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938, *L. rhamnosus* R0011 (CNCM I-1720), *L. helveticus* R0052 (CNCM I-1722) e *Lactobacillus paracasei* Lpc37 (ATCC SD5275) (BRASIL, 2020).

Existem muitos estudos sobre BAL com alegações probióticas. Entretanto, para ser considerada uma estirpe probiótica, o microrganismo deve preencher alguns pré-requisitos, tais como: comprovação de identidade que abrange a nomenclatura, depósito em coleção de culturas registrada no *World Data Center for Microorganisms* (WDCM), identificação da origem da linhagem, testes fenotípicos e genotípicos; comprovação de segurança, que abrange a identificação do grupo ou classe de risco, histórico de uso, ensaios *in vitro*, em animais e em humanos especificados pela legislação; além da comprovação dos benefícios, que abrange as alegações de propriedade funcional ou de saúde que devem ser caracterizadas, estudadas, avaliadas e comprovadas. Assim, todas essas comprovações exigem muitas pesquisas, o que torna o processo complexo e detalhado e, por isso, muitas BAL identificadas com potencial probiótico, não chegam de fato a serem reconhecidas como tal pelos órgãos oficiais competentes (BRASIL, 2021; ILSI BRASIL, 2022).

BACTÉRIAS LÁTICAS BIOCONSERVANTES

A presença de microrganismos patogênicos e/ou deterioradores nos alimentos representam problemas de saúde ao consumidor e perdas econômicas, tendo em vista que a deterioração causada por microrganismos altera a composição dos alimentos, o que compromete a sua qualidade e vida de prateleira. A presença de microrganismos patogênicos nos alimentos é relevante, uma vez que coloca em risco a saúde dos consumidores. Os microrganismos patogênicos mais comumente veiculados por alimentos que podem causar infecções e/ou intoxicações são *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2022; FORSYTHE, 2013). A qualidade e inocuidade dos alimentos está relacionada à ausência destes patógenos e a um limite aceitável de deterioradores, permitindo, assim, um alimento seguro para o consumo e com uma vida de prateleira estendida. Para esta finalidade, devem ser utilizadas matérias-primas e ingredientes de boa qualidade, além do emprego de boas práticas de fabricação, boas condições higiênico-sanitárias,

monitoramento correto da estocagem, transporte e armazenamento. Apesar disso, microrganismos indesejáveis podem chegar ao produto final e para evitar a sua presença, são utilizadas tecnologias no processamento ou emprego de conservantes aos alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2023).

Os conservantes são substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocadas por microrganismos ou enzimas, de acordo com a IN n° 211 de 1 de março de 2023 da ANVISA. Esta IN também especifica os conservantes permitidos em alimentos, como por exemplo, ácido sórbico, sorbato de sódio, sorbato de potássio, sorbato de cálcio, nisina, nitrato de sódio ou potássio, lisozima, cloridrato de lisozima, pimaricina e natamicina (BRASIL, 2023). Contudo, a declaração no rótulo de alguns destes conservantes tem interferido na decisão de compra pelos consumidores, uma vez que estes têm buscado por alimentos com o mínimo de ingredientes e com propriedades funcionais (ASIOLI *et al.*, 2017). Assim, as pesquisas por bioconservantes para uso em alimentos têm apresentado grande destaque, como por exemplo, o uso de BAL com atividade antimicrobiana em produtos fermentados ou não fermentados. Uma vez que, estas podem ser declaradas na lista de ingredientes como culturas lácticas, o que garante um rótulo mais limpo ou *clean label* (CARVALHO; BESSA, 2022; FISCHER; TITGEMEYER, 2023; MARUYAMA *et al.*, 2021).

A bioconservação ou biopreservação é definida como a extensão da vida de prateleira e aumento da segurança dos alimentos por meio de recursos naturais, o que inclui os microrganismos ou seus metabólitos (YUSUF, 2018). As BAL são capazes de produzir vários compostos como ácido láctico, ácido acético, diacetil, peróxido de hidrogênio, enzimas e bacteriocinas, que desempenham várias atividades, dentre elas a de bioconservação (SIAMANSOURI *et al.*, 2013). As bacteriocinas são metabólitos bacterianos e a sua utilização na forma purificada ou parcialmente purificada em alimentos é estudada há muitos anos, sendo o uso de algumas bacteriocinas autorizado em determinados países, como é o caso da nisina. Além disso, há estudos da utilização de bacteriocinas encapsuladas

diretamente em alimentos e em embalagens de alimentos, sendo que estas duas formas garantem uma liberação controlada das bacteriocinas nos alimentos e evita a sua inativação durante o processamento (EGHBAL *et al.*, 2022; GUMIENNA; GÓRNA, 2021).

O uso de culturas de BAL bacteriocinogênicas diretamente em alimentos pode conferir vantagens sobre o uso das bacteriocinas, uma vez que a produção das bacteriocinas pelas BAL pode ocorrer de forma continuada no alimento. Além disso, pode haver a produção de outros metabólitos pelas BAL nos alimentos que também atuam na inibição dos microrganismos; as BAL podem contribuir para as características físico-químicas e sensoriais dos alimentos. Adicionalmente, as bacteriocinas podem ser degradadas pelas matrizes alimentares, perdendo, assim, a sua atividade antimicrobiana (MACHADO, 2023; SILVA *et al.*, 2018). Outro ponto importante é a utilização de estirpes de BAL bacteriocinogênicas isoladas do mesmo alimento em que serão utilizadas como bioconservantes posteriormente, pois estas já estão mais adaptadas às condições daquele produto do que outras estirpes, o que pode torná-las mais resistentes e competitivas (KALHORO *et al.*, 2023).

Nos queijos artesanais, a presença de BAL impacta na fermentação e na produção do queijo, principalmente no desenvolvimento de sabor, aroma e textura, mas também produzem bacteriocinas, ácidos e outros metabólitos com atividade antimicrobiana, resultando na melhoria da qualidade e na segurança microbiológica do produto (ANTÔNIO; BORELLI, 2020). Pesquisas em queijos artesanais brasileiros são realizadas para a busca de novos isolados de BAL com atividade antimicrobiana e capazes de produzir bacteriocinas que poderão ser exploradas e aplicadas no setor industrial (HOSKEN *et al.*, 2023). Teixeira *et al.* (2021) isolaram estirpes de *Weissella* spp. de amostras de queijos artesanais de quatro diferentes regiões brasileiras e a maioria apresentou atividade antagonica contra *E. coli* ATCC 11229, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 e *S. aureus* ATCC 6538. Esta atividade foi associada à produção de compostos antibacterianos e à redução de pH, o que

comprova que as culturas desempenham um papel importante na qualidade dos queijos e sugere que futuros estudos possam ser realizados para avaliar o seu uso como culturas iniciadoras na indústria de laticínios.

BAL isoladas de leite de búfala também foram avaliadas quanto ao seu potencial antibacteriano por Kalhoro *et al.* (2023). Todos os isolados avaliados, *Lactobacillus paraplantarum* 11, *L. plantarum* 19, *Lactobacillus pentosus* 42, *L. pentosus* 93, *L. fermentum* 60 e *L. reuteri* 112, reduziram o crescimento dos patógenos *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria innocua* ATCC 33090, *S. enterica* sorovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Shigella dysenteriae* ATCC 11835, *S. aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Assim, estas BAL isoladas têm potencial para serem utilizadas como bioconservantes contra patógenos veiculados por alimentos.

Hoxha *et al.* (2023) isolaram 12 estirpes de BAL de produtos caseiros artesanais, como: produtos lácteos fermentados, carne seca crua e frutos fermentados espontaneamente e identificaram estes isolados como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KZM2-11-1 e KZM2-11-3; *L. plantarum* KO4-4, KC5-12, KC5-14, KZC8-21-1, KZC8-23-5, KBB7-1 e KBB11; *Latilactibacillus sakei* C10-31-3; *Loigolactibacillus coryniformis* KO3-7-5; e *Pediococcus pentosaceus* KC5-13. Posteriormente, estes autores avaliaram sua atividade antimicrobiana contra *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 18204, *Aspergillus flavus* NBIMCC 916, *Aspergillus niger* A3, *Fusarium proliferatum* BT 140 e *Penicillium claviforme* BT 136. Todas as BAL avaliadas inibiram o crescimento das bactérias *B. subtilis* ATCC 6633 e *E. coli* ATCC 25922 e dos fungos filamentosos *F. proliferatum* BT 140 e *P. claviforme* BT 136. Algumas estirpes inibiram o crescimento de *B. cereus* ATCC 11778, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. flavus* NBIMCC 916 e *A. niger* A3. Algumas das BAL avaliadas apresentam potencial para serem utilizadas como bioconservantes de alimentos, pois foram capazes de inibir bactérias

patogênicas Gram-positivas, Gram-negativas e fungos filamentosos.

No estudo de Binimelis *et al.* (2023) estirpes de BAL isoladas de leite de diferentes espécies foram combinadas e avaliadas contra os patógenos *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. As BAL combinadas foram *Levilactobacillus brevis* TUCO-5E (leite de porca), *Ligilactobacillus salivarius* TUCO-L2 (leite de lhama), *L. plantarum* TUCO-2 (leite de cabra), *P. pentosaceus* TUCO-3 (leite de gata), *L. plantarum* TUCO-5 (leite de porca), *Lactobacillus* sp. TUCO-16 (colostro de cadela) e *Lactobacillus* sp. TUCO-17 (leite de cadela). Os resultados mostraram que as diferentes combinações de BAL apresentaram maior atividade antibacteriana contra os patógenos avaliados em comparação com estas bactérias isoladamente, mostrando que há um efeito sinérgico entre as BAL avaliadas.

Com base na literatura consultada, apesar de muitos estudos avaliarem a atividade antimicrobiana *in vitro* de várias estirpes de BAL isoladas de alimentos e mostrarem sua eficácia na inibição de patógenos e deterioradores, de acordo com a definição da *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*, os estudos que avaliam a segurança destes isolados ainda são escassos. Nota-se a necessidade de trabalhos que relatem a resistência às condições tecnológicas de processamento dos alimentos e do trato gastrointestinal, bem como a identificação dos mecanismos de ação das BAL. Frente a isso, são necessários mais estudos *in vitro*, *in vivo* e *in situ* para uma avaliação completa das estirpes mais promissoras e de seu mecanismo de ação para solicitar a permissão de uso em alimentos como bioconservante junto aos órgãos oficiais competentes (GAO *et al.*, 2019; TODOROV *et al.*, 2022). Entretanto, no mercado há uma variedade de estirpes de BAL com atividade antimicrobiana que são comercializadas e utilizadas para a fabricação de alimentos, principalmente em produtos fermentados como queijos e leites fermentados.

BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS

As bacteriocinas são peptídeos ribossomais, divididas em classes e subclasses que consideram o tamanho da molécula, estrutura, características físico-químicas, genéticas e mecanismo de ação. Entretanto, há controvérsias entre os autores sobre o número de classes, mas comumente são descritas três classes: classe I dos lantibióticos, classe II dos pequenos peptídeos termoestáveis e classe III dos peptídeos termolábeis de alto peso molecular. Já Heredia-Castro *et al.* (2017) descreveram mais duas classes: classe IV dos peptídeos grandes e de estrutura complexa, que se encontram associados a carboidratos ou lipídios, e a classe V dos peptídeos de estrutura circular. Contudo, Cotter *et al.* (2005) defendem a divisão em apenas duas classes: a dos lantibióticos que são moléculas que apresentam lantionina e a das bacteriocinas que não contém lantionina. O mecanismo de ação das bacteriocinas para inibição das bactérias é por meio da formação de poros na membrana celular ou inibição da expressão gênica e produção de proteínas (COTTER *et al.*, 2013). Além disso, as bacteriocinas são classificadas quanto ao espectro de ação, sendo as bacteriocinas produzidas por uma determinada espécie bacteriana e com atividade antagônica contra a mesma espécie consideradas com pequeno espectro de ação, mas quando atuam sobre vários gêneros são consideradas com amplo espectro (COTTER *et al.*, 2013; HEREDIA-CASTRO *et al.*, 2017).

As BAL são as principais produtoras de bacteriocinas, como: *L. lactis* produtor de nisina, a primeira bacteriocina descoberta em 1928 (ROGERS; WHITTIER, 1928); *L. lactis* produtoras de lacticinas; *L. plantarum* produtoras de plantarinas; *Pediococcus* spp., *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* produtoras de pediocinas; e *Enterococcus* spp. produtoras de enterocinas (MACHADO, 2023; SILVA *et al.*, 2018). É importante ressaltar que as BAL não são os únicos microrganismos produtores de bacteriocinas, mas são os mais estudados na área de alimentos por despertarem o interesse da indústria devido ao seu potencial na bioconservação dos ali-

mentos, e também por poderem conferir características sensoriais e funcionais adicionais (MACHADO, 2023; NEGASH; TSEHAI, 2020).

A nisina é uma bacteriocina comercializada desde 1953, considerada *GRAS* e aprovada pelos órgãos oficiais competentes de mais de 80 países para a sua utilização em alimentos na forma purificada ou parcialmente purificada, incluindo *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Food Safety Authority* (EFSA) (COTTER *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2021; FIELD *et al.*, 2023). Outras bacteriocinas não são aprovadas pelo FDA de acordo com a lista de aditivos alimentares atualizada em 26 de setembro de 2023 (FDA, 2023a) e em 31 de outubro de 2023 (FDA, 2023b), mas são aprovadas por órgãos oficiais competentes de outros países e utilizadas em algumas preparações multicomponentes comercializadas para a fabricação de alimentos, como enterocina, leucocina, pediocina e sakacina (TODOROV *et al.*, 2022).

As bacteriocinas são seguras em alimentos por serem sensíveis a enzimas digestivas tipo proteases e, portanto, são inativadas no trato gastrointestinal, não interferem na atividade dos microrganismos presentes na microbiota intestinal natural e não são tóxicas para células eucarióticas (EGAN *et al.*, 2016). Em alimentos, as bacteriocinas podem ser utilizadas na sua forma purificada ou parcialmente purificada, bem como podem ser adicionadas culturas bacteriocinogênicas ou ingredientes previamente fermentados por estas culturas (STRACK *et al.*, 2020). A adição de BAL bacteriocinogênicas no lugar de bacteriocinas purificadas para a bioconservação de alimentos é uma alternativa, uma vez que muitas destas BAL são consideradas *GRAS* e aprovadas para uso como culturas na fabricação de alimentos. Outra vantagem é a produção de bacteriocinas por estas bactérias durante todo o processamento e armazenamento dos alimentos, sendo importante para inibição dos microrganismos indesejáveis durante a vida de prateleira do produto (SILVA *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação de BAL com potencial probiótico, bacteriocinogênico e antimicrobiano para

serem utilizadas em alimentos é de grande importância para o desenvolvimento de alternativas e soluções com base nessas propriedades dessas bactérias e vem sendo realizada há anos. Entretanto, com um mercado consumidor cada vez mais preocupado e exigente, a demanda por estas BAL e de seus metabólitos aumentou, principalmente para a bioconservação de alimentos, a fim de garantir alimentos mais seguros, com maior vida de prateleira e com menor adição de ingredientes e de conservantes, tendo em vista a busca dos consumidores por produtos mais naturais. Pesquisas ainda são necessárias para identificar novas BAL e seus metabólitos, bem como avaliar sua segurança e resistência às condições do trato gastrointestinal, identificar os mecanismos da ação, avaliar as propriedades tecnológicas e determinar os protocolos para a sua aplicação na indústria de alimentos.

AGRADECIMENTOS

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - Instituto de Laticínios Cândido Tostes (EPAMIG ILCT) e às bolsas concedidas no projeto PPE-00037-21 pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERÊNCIAS

ANTÔNIO, M. B.; BORELLI, B. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 204-221, 2020. DOI: 10.14295/2238-6416.v75i3.799

ASIOLI, D. *et al.* Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, p. 58-71, 2017. DOI: 0.1016/j.foodres.2017.07.022

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijos. 1996. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 48, p. 3977, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de

2007. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 205, p. 4, 24 out. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 241, de 26 julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 144, p. 97, 27 jul. 2018
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 76 de 5 de novembro de 2020. Dispõe sobre a atualização das listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 215, p.75, 11 nov. 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. **Guia nº 21/2021**. v. 2, Brasília, 05 de maio de 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil**. Informe 2022. Janeiro de 2022. Disponível em: www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022 Acesso em: jun. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 211 de 1 de março de 2023. Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 46, p. 110, 8 mar. 2023.
- CARVALHO, C.; BESSA, M. As bactérias ácido lácticas no contexto da biotecnologia. **Milkpoint**, 2022. Disponível em: www.milkpoint.com.br/colunas/ilctepamig/as-bacterias-acido-laticas-no-contexto-da-biotecnologia-228500/ Acesso em: maio 2023.
- COTTER P. D., HILL, C., ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p.777-88, 2005. DOI: 10.1038/nrmicro1273
- COTTER, P.; ROSS, R.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v.11, n.2, p. 95–105, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro2937
- DOSTA, M. C. M. *et al.* Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. **Contactos**, v. 73, p. 63-72, 2009.
- EGAN, K. *et al.* Bacteriocins: novel solutions to age-old spore-related problems? **Frontiers Microbiology** v. 7, p. 461, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00461
- EGHBAL, N.; VITON, C.; GHARSALLAOUI, A. Nano and microencapsulation of bacteriocins for food applications: A review. **Food Bioscience**, v. 50, p. 102173, 2022. DOI: 10.1016/j.fbio.2022.102173
- FDA, Food and Drug Administration. **Food Additive Status List**. 2023a. Disponível em: fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list Acesso em: nov. 2023.
- FDA - Food and Drug Administration. **Inventory of effective food contact substance (FCS) Notifications**. 2023b. Disponível em: cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=FCN&sort=FCN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search= Acesso em: nov. 2023.
- FIELD, D. *et al.* After a century of nisin research, where are we now and where are we going? **FEMS microbiology reviews**, v. 47, n. 3, 2023. DOI: 10.1093/femsre/fuad023
- FISCHER, S. W.; TITGEMEYER, F. Protective cultures in food products: From science to market. **Foods**, v. 12, n. 7, p. 1541, 2023. DOI: 10.3390/foods12071541
- FREIRE, T. T. *et al.* Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e513101119964, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i11.19964
- FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013. p.19-81.
- GAO, Z. *et al.* Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review. **Journal of food protection**, v. 82, n. 3, p. 441-453, 2019. DOI: 10.4315/0362-028XJFP-18-303
- GÁMEZ, H. J.; GOYES, A. J. M.; BENAVIDES, J. A. M. **Microbiología Aplicada a la Producción Animal**. 2. ed. San Juan de Pasto: Editorial Universidad de Nariño, 2023. 259p.
- GUMIENNA, M.; GÓRNA, B. Antimicrobial food packaging with biodegradable polymers and bacteriocins. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3735, 2021. DOI: 10.3390/molecules26123735
- HEREDIA-CASTRO, P. Y. *et al.* Bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. **Interiencia**, v. 42, n. 6, p. 340-346, 2017.

- HOSKEN, B. O. *et al.* Underexplored potential of lactic acid bacteria associated with artisanal cheese making in Brazil: Challenges and opportunities. **Fermentation**, v. 9, n. 5, p. 409, 2023. DOI: 10.3390/fermentation9050409
- HOXHA, R.; EVSTATIEVA, Y.; NIKOLOVA, D. New lactic acid bacterial strains from traditional fermented foods-bioprotective and probiotic potential. **Journal of Chemical Technology & Metallurgy**, v. 58, n. 2, 2023. DOI: 10.59957/jctm.v58i2.50
- ILSI BRASIL, Probióticos alimentares, prebióticos e a microbiota intestinal na saúde humana, **FT Funcionais, Nutrientes e Suplementos Alimentares**, São Paulo, 2022.
- ISAPP, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, **Infographics Probiotics**, 2019. Disponível em: isappscience.org/wp-content/uploads/2019/04/Probiotics_0119.pdf Acesso em: abr. 2023.
- KALHORO, M. S. *et al.* Antimicrobial activities and biopreservation potential of lactic acid bacteria (LAB) from raw buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2023, 2023. DOI: 10.1155/2023/8475995
- KINDSTEDT, P. **Cheese and culture: a history of cheese and its place in western civilization**. Vermont: Chelsea Green Publishing, p. 3-81, 2012.
- KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J. **Lactic acid bacteria**. In: König, H.; Unden, G.; Fröhlich, J.; *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, p. 3-41, 2017.
- LEEUWENDAAL, N. K. *et al.* Fermented foods, health and the gut microbiome. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1527, 2022. DOI: 10.3390/nu14071527
- LISTER, J. B. On the lactic fermentation and its bearings on pathology. **Transactions of the Pathological Society of London**, v. 29, p.425-467, 1878.
- LÓPEZ-MENDOZA, J. *et al.* Bioactive compounds in cheeses: biosynthesis, biological activity, and contribution of lactic acid bacteria. **Agronomía Mesoamericana**, v. 34, n. 2, 51432, 2023. DOI: 10.15517/am.v34i2.51432
- MACHADO, T. F. Potencial uso de bacteriocinas na conservação de alimentos. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2023. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1151945/1/DOC-199.pdf> Acesso em: abr. 2023.
- MARUYAMA, S.; STRELETSKAYA, N. A.; LIM, J. Clean label: Why this ingredient but not that one? **Food Quality and Preference**, v. 87, p. 104062, 2021. DOI: 10.1016/j.foodqual.2020.104062
- MÄYRA-MÄKINEN, A.; BIGRET, M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker**, v. 139, p. 175-198, 2004. DOI: 10.1201/9780824752033.ch5.
- NEGASH, A. W.; TSEHAI, B. A. Current applications of bacteriocin. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020. DOI: 10.1155/2020/4374891
- PASTEUR, L. Mémoire sur la fermentation appelée lactique. **Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 45, p. 913-916, 1857.
- BINIMELIS, A. I. P. *et al.* Evaluación de la sinergia de la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias lácticas contra patógenos. **Ciencia Veterinaria**, v. 25, n. 1, p. 1-22, 2023. DOI: 10.19137/cienvet202325101
- RIBEIRO, A.C. *et al.* *Listeria monocytogenes*: An Inconvenient hurdle for the dairy industry. **Dairy**, v. 4, n. 2, p. 316-344, 2023. DOI: 10.3390/dairy4020022
- ROGERS, L. A.; WHITTIER, E. O. Limiting Factors in the lactic fermentation. **Journal of Bacteriology**, v. 16, n. 4, p. 211-229, 1928. DOI: 10.1128/jb.16.4.211-229.1928
- SIAMANSOURI, M., MOZAFFARI, S., ALIKHANI, F. E. Bacteriocins and lactic acid bacteria. **Journal of Biology**, v. 2, n. 5, p. 227-234, 2013.
- SILVA, C.C.G.; SILVA, S.P.M.; RIBEIRO, S.C. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 594, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00594
- STRACK, L. *et al.* Food biopreservation using antimicrobials produced by lactic acid bacteria. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, e998986666, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.6666
- TEIXEIRA, C. G. *et al.* Biodiversity and technological features of *Weissella* isolates obtained from Brazilian artisanal cheese-producing regions. **LWT**, v. 147, p. 111474, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111474
- TIAN, F. Introduction. In: CHEN, Wei. **Lactic acid bacteria. Omics and Functional Evaluation**, China: Springer, p.1-33, 2019.
- TODOROV, S. D. *et al.* Use of bacteriocins and bacteriocinogenic beneficial organisms in food products: benefits, challenges, concerns. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 3145, 2022. DOI: 10.3390/foods11193145
- TREJO-GONZÁLEZ, L. *et al.* Bacteriocins produced by LAB

isolated from cheeses within the period 2009–2021: A review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 2, p. 238-251, 2022. DOI: 10.1007/s12602-021-09825-0

WRIGHT, A. V.; AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: an introduction. *In*: VINDEROLA, G. *et al.* **Lactic acid bacteria**. Boca Raton: CRC Press, p. 1-16, 2019.

YUSUF, M. Natural Antimicrobial Agents for Food Biopreservation. *In*: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M.,

Food Packaging and Preservation. Boca Raton: Academic Press, v. 9, p. 409-438, 2018.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobaillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobaillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107