

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Bacteriocinas: uma revisão bibliográfica sobre potenciais aplicações
terapêuticas e os desafios em torno de seu emprego**

Isabela Copetti

Porto Alegre
2021

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Bacteriocinas: uma revisão bibliográfica sobre potenciais aplicações
terapêuticas e os desafios em torno de seu emprego**

Trabalho apresentado como exigência
para aprovação na atividade de
Trabalho de Conclusão de Curso de
Farmácia da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Ana Paula Guedes Frazzon por todos os conhecimentos transmitidos e pela orientação e ajuda decidadas durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos professores do meu curso pelo ensino fornecido.

Agradeço aos meus pais por toda a educação e o apoio que me proporcionaram ao longo da vida.

RESUMO

As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos bacterianos sintetizados por ribossomos, com atividade inibitória contra diversos micro-organismos e apresentam grande potencial de uso terapêutico. Estudos realizados nas últimas décadas vêm demonstrando a influência favorável das bacteriocinas na capacidade de colonização e sobrevivência de suas cepas produtoras. O emprego de bacteriocinas produzidas por bactérias *in situ* como probióticos para modular a composição da microbiota humana, visando eliminar ou inibir o crescimento de cepas patogênicas, tem se mostrado promissor. Além disso, considera-se a possibilidade de combater bactérias patogênicas por meio de combinações com atividade sinérgica de bacteriocinas com antimicrobianos convencionais. Neste trabalho de revisão bibliográfica foram apresentados as principais características estruturais e funcionais das bacteriocinas, as metodologias utilizadas para caracterizá-las, suas potenciais aplicações biotecnológicas e os desafios em torno de seu emprego.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Definição e Classificação de Bacteriocinas	7
2.1. Aplicação industrial de bacteriocinas	12
2.1.1. Nisina	13
2.1.2. Pediocina PA-1	13
2.1.3. Outras bacteriocinas	14
3. Genética e biossíntese das bacteriocinas	14
4. Atividade antimicrobiana das bacteriocinas frente a outras bactérias	15
5. Mecanismos de ação descritos para as bacteriocinas	16
6. Identificação, purificação e caracterização das bacteriocinas	17
7. Atuação das bacteriocinas sobre a microbiota	18
8. Atividade das bacteriocinas sobre biofilmes	20
9. Potenciais aplicações terapêuticas	22
9.1. Aplicação como probióticos	22
9.1.1. Ação frente a placa dentária	23
9.1.2. Para o tratamento de otite média aguda	24
9.1.3. No tratamento de transtornos do trato gastrointestinal	25
9.1.4. Prevenção da colonização por <i>Streptococcus agalactiae</i> do trato vaginal	25
9.1.5. Considerações sobre o uso de probióticos de cepa produtora de bacteriocina.....	26
9.2. Terapia combinada de bacteriocinas com antimicrobianos convencionais.....	26
9.2.1. Nisina associada a antimicrobianos.....	27
9.2.2. Outras bacteriocinas associadas a antimicrobianos.....	27
9.2.3. Considerações sobre a combinação bacteriocinas e antimicrobianos	28
10. Resistência bacteriana frente às bacteriocinas	28
10.1. Resistência inata	29
10.2. Resistência adquirida às bacteriocinas	29
11. Discussão: Vantagens e desvantagens do emprego das bacteriocinas	30
11.1. Vantagens	30
11.2. Desvantagens	31
11.3. Desafios do uso das bacteriocinas na terapia	31
12. Conclusão	32

13. Referências bibliográficas 32

1. Introdução

Um dos grandes marcos do século XX foi a descoberta de antibióticos pelo médico inglês Alexander Fleming, o qual revolucionou a medicina, visto que possibilitou o tratamento de infecções bacterianas que até então seriam letais ou muito debilitantes. Entretanto, o uso contínuo e excessivo de antimicrobianos na saúde e na agricultura tem impulsionado a seleção evolutiva de organismos resistentes. Atualmente encaramos um problema crescente de saúde pública mundial devido ao surgimento de bactérias patogênicas resistentes aos tratamentos farmacológicos disponíveis.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica como "alarmante" a situação criada pelo uso indiscriminado de antibióticos, e estima que cerca de 10 milhões de pessoas morrerão de infecções causadas por bactérias resistentes até 2050 se nada for feito para tentar reverter a atual situação. Além do ritmo preocupante do desenvolvimento de resistência pelos micro-organismos, o progresso na descoberta de novos antibacterianos diminuiu significativamente nas últimas décadas.

Entre as estratégias disponíveis para solucionar este problema, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos são considerados. As novas alternativas incluem compostos derivados de plantas, bacteriófagos e peptídeos antimicrobianos conhecidos como bacteriocinas. As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos bacterianos sintetizados por ribossomos, com atividade inibitória contra diversas bactérias e apresentam grande potencial biotecnológico. Neste trabalho de revisão bibliográfica foram apresentadas as principais características estruturais e funcionais das bacteriocinas, suas potenciais aplicações terapêuticas, as metodologias utilizadas para caracterizá-las e os desafios em torno de seu emprego.

2. Definição e Classificação de Bacteriocinas

O estudo das bacteriocinas data de 1925, quando André Gratia observou a inibição de uma cepa de *Escherichia coli* sobre o crescimento de outras cepas da mesma espécie. A investigação foi continuada por Fredericq, Hamon, Péron, entre outros, e, embora a inibição de uma cepa bacteriana por outra tenha sido, as bacteriocinas se distinguiram dos outros antimicrobianos conhecidos na época e,

portanto, receberam um nome distinto por Jacob, Lwoff, Siminovitch e Wollman em 1953 (Reeves, 1965).

Bacteriocinas são peptídeos com atividade antimicrobiana sintetizados ribossomicamente e liberados no meio extracelular. Essas moléculas são sintetizadas por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e arqueias e constituem um grupo heterogêneo de peptídeos com relação ao tamanho, estrutura, modo de ação, potência e aspecto antimicrobiano, mecanismos de imunidade e alvos celulares. As bacteriocinas apresentam ação bactericida ou bacteriostática (Cotter et al., 2013; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

Devido à natureza heterogênea das bacteriocinas, diferentes critérios para classificá-las têm sido descritos. A forma de classificação mais aceita é baseada em diferenças estruturais. Entretanto, diferentes classes e subclasses têm sido propostas ao longo dos anos (Figura 1).

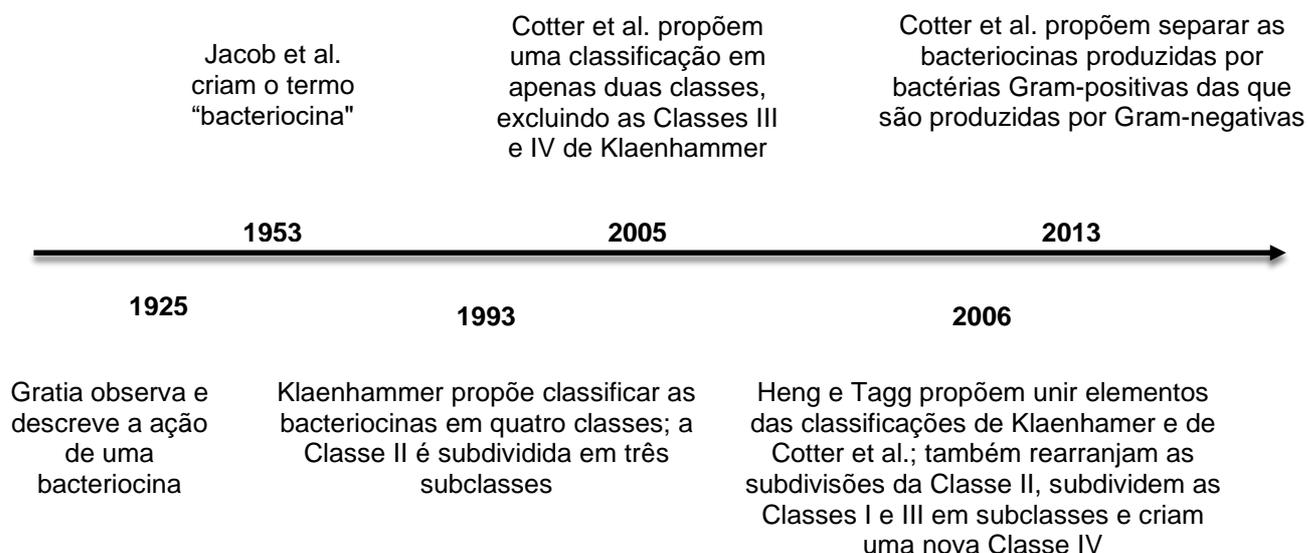


Figura 1. Linha do tempo demonstrando as diferentes classificações das bacteriocinas baseada em diferenças estruturais propostas ao longo dos anos em ordem cronológica (adaptado de Ogaki et al., 2015)

Em 1993, Klaenhammer separou as bacteriocinas em quatro classes:

- Classe I: referente às bacteriocinas de peso molecular < 5kDa, termoestáveis, que sofrem modificações pós-transcricionais e que contém aminoácidos incomuns (lantionina, 3-metil lantionina). Essas bacteriocinas são chamadas de lantibióticos.

- Classe II: referente às bacteriocinas de peso molecular <10 kDa, termoestáveis e que não sofrem modificações pós-transcricionais. A Classe II seria subdividida em IIa (tipo-pediocina), IIb (composta de dois peptídeos) e IIc (outras bacteriocinas).
- Classe III: referente às bacteriocinas de peso molecular > 30kDa e termolábeis.
- Classe IV: referente a complexos de bacteriocinas que contêm lipídeos ou carboidratos na suas estruturas.

Em 2005, Cotter e colaboradores excluíram as Classes III e IV da classificação de Klaenhammer (1993) e propuseram dividir as bacteriocinas em apenas duas classes principais:

- Classe I: referente aos lantibióticos.
- Classe II: referente às bacteriocinas não-lantibióticos. A Classe II seria subdividida em IIa (tipo-pediocina), IIb (dois peptídeos), IIc (cíclicos) e IId (outros).

Em 2006, Heng e Tagg propuseram uma classificação que, além de unir divisões de classes adotadas por Klaenhammer (1993) e Cotter e colaboradores (2005), subdividiria as bacteriocinas da Classe I em Ia (lantibióticos lineares), Ib (globulares) e Ic (multicomponentes) e as bacteriocinas da Classe III em IIIa (bacteriolíticas) e IIIb (não-bacteriolíticas). Eles também propuseram rearranjar as bacteriocinas da Classe II em IIa (tipo-pediocina), IIb (outros) e IIc (multicomponente) e agrupar os peptídeos cíclicos em uma Classe IV.

Em 2013, Cotter e colaboradores propuseram separar as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas das que são produzidas por Gram-negativas:

- Classe I: referente às bacteriocinas produzidas por Gram-positivas que sofrem extensas modificações pós-traducionais.
- Classe II: referente às bacteriocinas produzidas por Gram-positivas que não sofrem modificações pós-traducionais ou que sofrem modificações modestas, como a formação de pontes dissulfeto, a circularização ou a adição de N-formilmetionina.
- Microcinas: referente às bacteriocinas produzidas por Gram-negativas de peso molecular <10kDa.
- Colicinas: referente às bacteriocinas produzidas por Gram-negativas de peso molecular >10kDa.

A classificação das bacteriocinas continua sendo bastante debatida e controversa, sendo comum designações diferentes para uma mesma bacteriocina, dependendo do autor. Cerca de onze subclasses de lantibióticos já foram sugeridas. Alguns autores atribuem as bacteriocinas contendo ligações entre um enxofre de um

resíduo de cisteína e um α -carbono (e.g., turicina CD e subtilosina A) a uma subclasse chamada de sactibióticos. Outros atribuem as bacteriocinas caracterizadas por sua estrutura distinta como laço ou *looping* (e.g., microcina J25) como lasso-peptídeos (Hassan et al., 2012; Cotter et al., 2013; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

Apesar da falta de consenso em relação à classificação, para este trabalho foram elaboradas duas tabelas agrupando e descrevendo as bacteriocinas de acordo com as classificações mais comumente observadas em artigos científicos publicados nos últimos anos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Classificação das bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-positivas de acordo com tamanho, composição e modificações moleculares (Hassan et al., 2012; Cotter et al., 2013; Perez et al., 2014; Collins et al., 2017; Garcia-Gutierrez et al., 2019; Simons et al., 2020).

Classe I	Classe II	Classe III
<p>Peso molecular <5kDa; termoestáveis; modificações pós-transcricionais; presença de aminoácidos incomuns (lantionina, 3-metil lantionina); chamados de lantibióticos</p> <p>e.g., nisina, epidermina, gallidermina, mutacina 1140, subtilina, lacticina 3147, turicina CD, nukacina ISK-1</p>	<p>Peso molecular <10 kDa; termoestáveis; ausência de modificações pós-transcricionais</p>	<p>Peso molecular >30kDa; termolábeis</p>
	<p>Subclasse IIa</p>	<p>Subclasse IIIa</p>
	<p>Estrutura linear com pontes dissulfeto entre dois resíduos de cisteína; forte atividade antilisterial; sequência conservada (YGNGVXC) na região N-terminal; chamadas de tipo-pediocina;</p> <p>e.g., pediocina PA-1, enterocina A, enterocina P, leucocina A, leucocina C, sakacina P</p>	<p>Bacteriolíticas; chamadas de bacteriolisinas</p> <p>e.g., lisostafina</p>
	<p>Subclasse IIb</p>	<p>Subclasse IIIb</p>
	<p>Formados por dois peptídeos que agem sinergicamente;</p> <p>e.g., lactococina G, lactococina Q, plantaricina EF, plantaricina JK, salivaricina P</p>	<p>Não-bacteriolíticas</p> <p>e.g., helveticina J</p>
	<p>Subclasse IIc</p>	
	<p>Estrutura circular; catiônicos; hidrofóbicos;</p> <p>e.g., enterocina AS-48, garvicina ML, lactociclicina Q, leucociclicina Q</p>	
	<p>Subclasse IId</p>	
	<p>Bacteriocinas que não se encaixam nas outras subclasses (estrutura linear; formados por um peptídeo; não-tipo-pediocina;)</p> <p>e.g., lactococina A, lactococina B, enterocina B, garvicina KS, lacticina Q, leucocina Q, leucocina N, liqueniocina 50.2</p>	

Tabela 2: Classificação das bacteriocinas sintetizadas por bactérias Gram-negativas de acordo com tamanho, composição e modificações moleculares (Hassan et al., 2012; Cotter et al., 2013; Perez et al., 2014; Collins et al., 2017; Garcia-Gutierrez et al., 2019; Simons *et al.*, 2020)

Microcinas	Colicinas	Tipo-Colicinas	Piocinas/Tipo-cauda de fagos
Peso molecular <10kDa	Peso molecular >10 kDa; produzidas por <i>Escherichia coli</i> ; e.g., colicina A, colicina B, colicina E1, colicina K, colicina 5	Peso molecular >10 kDa; produzidas por outras espécies; e.g., klebicina KpneM, klebicina KpneM2, klebicina KvarM, S-piocina	Peso molecular >10 kDa; cilíndricos; formadores de poros na membrana celular; e.g., piocina S6, R-piocina, F-piocina
Subclasse I			
Peso molecular <5kDa; modificações pós-traducionais; codificadas em plasmídeos; e.g., microcina C7, microcina J25, microcina B17, microcina D93			
Subclasse II			
Peso molecular entre 5 e 10kDa; modificações pós-traducionais mínimas ou inexistentes; codificadas em cromossomos; e.g., microcina E492, microcina V, microcina L, microcina H47, microcina 24			

2.1. Aplicação industrial de bacteriocinas

Com base em estudos bioquímicos e genéticos, várias bacteriocinas já foram caracterizadas, como, por exemplo, lactocinas, epideminas, lactococcinas, plantaricinas, pediocinas, enterocinas, mersacidina entre outras. As bactérias ácido-

láticas são membros da microbiota normal de muitos alimentos e conhecidas por produzirem uma gama de bacteriocinas. Deste modo, um dos principais setores impactados pelas bacteriocinas é a indústria agroalimentar, onde elas vêm sendo utilizadas e exploradas para o controle e prevenção do crescimento de certos microorganismos em alimentos (Cotter et al., 2005; Simons et al., 2020).

2.1.1. Nisina

A nisina é uma bacteriocina classificada como um lantibiótico, produzida por um grupo de bactérias Gram-positivas, o qual inclui espécies de *Lactococcus* e *Streptococcus*. Nas últimas décadas, a nisina foi amplamente utilizada como um biopreservativo alimentar. Ela foi aprovada pela Organização Conjunta das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS) em 1969 como um aditivo alimentar seguro, e pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1988, recebendo uma designação de "geralmente considerada segura" (GRAS) para uso em queijos processados. Esta é a única bacteriocina aprovada como conservante de alimentos em mais de 40 países, incluindo o Brasil. No entanto, o interesse na nisina começou a se expandir para além da indústria alimentícia, visto que diversos estudos têm revelado um grande potencial de aplicação da nisina na terapia (Shin et al., 2016).

2.1.2. Pediocina PA-1

Até o momento, a nisina foi a única bacteriocina licenciada como conservante de alimentos. No entanto, o potencial da pediocina PA-1 já foi explorado comercialmente utilizando suas cepas produtoras e/ou seus fermentados contendo a pediocina PA-1. Tendo em vista sua associação típica com a fermentação de alimentos e sua longa tradição como bactérias de qualidade alimentar, as bactérias ácido-láticas produtoras de pediocina PA-1 são designadas como "geralmente reconhecidas como seguras" (GRAS) e, portanto, os benefícios desta bacteriocina já vêm sendo utilizados dessa maneira. Embora a pediocina PA-1 não tenha um espectro antimicrobiano tão amplo quanto o da nisina, ela apresenta uma atividade particularmente forte contra *Listeria monocytogenes*, uma bactéria patogênica de preocupação significativa na indústria alimentícia. (Rodríguez et al., 2002)

2.1.3. Outras bacteriocinas

Além das preparações disponíveis comercialmente de nisina e pediocina PA-1, outras bacteriocinas, como a enterocina AS-48, uma bacteriocina circular, e a lacticina 3147, um lantibiótico de dois peptídeos, têm apresentado um potencial futuro como aditivos alimentares. A capacidade da enterocina AS-48 e da lacticina 3147 em controlar bactérias deteriorantes e de inativar cepas patogênicas presentes em diversos produtos alimentícios de origem animal e vegetal tem sido amplamente evidenciada. (Gálvez et al., 2007; Suda et al., 2012; Grande Burgos et al., 2014).

3. Genética e biossíntese das bacteriocinas

Os determinantes genéticos para a expressão das bacteriocinas estão presente no cromossomo ou em plasmídeos. Vários agrupamentos de genes envolvidos na biossíntese de bacteriocinas já foram descritos, observando-se características em comum entre as várias classes. O *operon* de genes dos lantibióticos (classe I) inclui genes que codificam o peptídeo precursor, proteínas responsáveis pela imunidade inata, um transportador ABC, enzimas de modificação, um sistema regulatório de dois componentes e o gene regulador da expressão (Figura 2). O *cluster* de genes de bacteriocinas tipo-pediocina (classe IIa) inclui genes que codificam o peptídeo precursor, proteínas responsáveis pela imunidade inata, um transportador ABC, uma proteína para translocação extracelular e o sistema regulatório de três componentes, composto por um peptídeo indutor, uma proteína histidina quinase associada à membrana e um regulador de resposta citoplasmática. O *cluster* de genes de bacteriocinas circulares (classe IIc) inclui genes que codificam o peptídeo precursor, uma proteína responsável pela imunidade inata, um transportador ABC e uma proteína de membrana pertencente à família de proteínas DUF95, que se presume estar envolvida na circularização da bacteriocina, apesar da falta de evidência experimentais (Perez et al., 2018; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

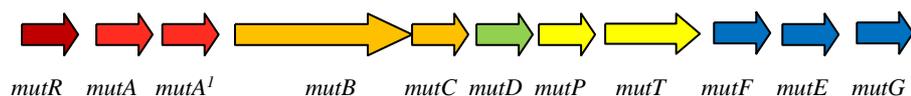


Figura 2. Exemplo da organização do *operon* de genes envolvidos na biossíntese do lantibiótico mutacina I de *Streptococcus mutans*. Em bordô: gene regulatório; vermelho: proteína precursora (codifica o pró-peptídeo); laranja: proteínas de modificação; verde: um gene adicional; amarelo: relacionado com transporte e processamento, e azul: imunidade (adaptado de Kamiya et al., 2011).

A maioria das bacteriocinas são sintetizadas pelos ribossomos como peptídeos precursores compostos por um peptídeo líder/sinal N-terminal e um pro-peptídeo principal C-terminal. O peptídeo líder N-terminal pode servir como uma proteção para a cepa produtora contra a ação antimicrobiana do propeptídeo C-terminal, sendo clivado apenas quando o peptídeo precursor for secretado para o exterior da célula; ou ele pode desempenhar um papel importante na maturação e transporte do pró-peptídeo C-terminal, servindo como um sítio de reconhecimento para enzimas envolvidas nesses processos ou garantindo que o pró-peptídeo C-terminal esteja em uma conformação adequada para interagir com essas enzimas. No entanto, algumas bacteriocinas atípicas são sintetizadas sem uma extensão N-terminal, sendo chamadas de "bacteriocinas sem líder" (por exemplo, enterocina L50, garvicina KS, lacticina Q). Essas bacteriocinas não passam por nenhuma modificação pós-traducional e se tornam ativas logo após a tradução (Perez et al., 2018; Garcia-Gutierrez et al., 2019; Simons et al., 2020).

As cepas produtoras de bacteriocinas são protegidas da atividade de seus próprios produtos por sistemas de imunidade. Esses sistemas variam, mas geralmente dependem da produção de uma única proteína que bloqueia a entrada da bacteriocina na membrana ou que protege um alvo específico. Os genes que codificam essas proteínas são geralmente encontrados nos *clusters* de genes da bacteriocina (Bastos et al., 2015).

4. Atividade antimicrobiana das bacteriocinas frente a outras bactérias

O espectro de ação e a potência da atividade antimicrobiana das bacteriocinas são bastante diversificados e variam entre e dentro das várias classes. Algumas bacteriocinas apresentam um espectro restrito, tendo atividade contra cepas

estritamente relacionadas às cepas produtoras, enquanto que outras apresentam um espectro amplo, contra uma variedade de gêneros diferentes. As cepas produtoras de bacteriocina são protegidas da atividade de seus próprios produtos por sistemas de imunidade; conseqüentemente, uma cepa produtora de bacteriocina normalmente não é sensível à ação de sua bacteriocina produzida. Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas geralmente apresentam melhor atividade contra bactérias Gram-positivas, e bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas apresentam melhor atividade contra bactérias Gram-negativas. A membrana externa das espécies Gram-negativas geralmente as protege das bacteriocinas produzidas por espécies Gram-positivas. Entretanto, sob condições de estresse, como ambientes ácidos, altamente salinos, contendo quelantes ou com alta variação de temperatura, certas bactérias Gram-negativas tornam-se sensíveis a bacteriocinas produzidas por espécies Gram-positivas. (Cotter et al., 2013; Bastos et al., 2015; Garcia-Gutierrez et al., 2019; Meade et al., 2020; Simons et al., 2020).

5. Mecanismos de ação descritos para as bacteriocinas

Bacteriocinas possuem diferentes mecanismos de ação. Esses mecanismos podem ser divididos em: (i) aqueles que funcionam essencialmente no envoltório celular, interferindo na integridade deste, e (ii) aqueles que funcionam essencialmente no interior da célula, interferindo com a expressão gênica e síntese proteica. A interferência na integridade da membrana celular bacteriana pode ser o resultado da interação direta da bacteriocina com a membrana ou com uma molécula de docagem, como o componente Lipídio II, o sistema Manose Fosfotransferase (Man-PTS) ou algum outro receptor específico. Subseqüentemente ocorrerá a permeabilização da membrana e formação de poros, induzindo vazamento de íons e metabólitos, despolarização do potencial da membrana, desregulação osmótica e, finalmente, lise celular. As bacteriocinas que interagem com o Lipídio II, além de produzirem poros na membrana celular, inibem a síntese da parede celular. É importante considerar que as bacteriocinas que interagem com o Lipídio II ligam-se a sítios diferentes que a vancomicina, e assim mantém atividade contra patógenos Gram-positivos resistentes à vancomicina. A interferência na expressão gênica e síntese proteica resulta da inibição ou degradação de enzimas intracelulares essenciais nos metabolismos de

ácidos nucleicos e proteínas (Cotter et al., 2013; Bastos et al., 2015; Perez et al., 2018; Garcia-Gutierrez et al., 2019; Meade et al., 2020; Simons et al., 2020).

Observa-se características em comum dentro das várias classes: muitos lantibióticos atuam interagindo com o Lipídio II, embora haja algumas exceções. As bacteriocinas tipo-pediocina (classe IIa) atuam interagindo com o sistema Man-PTS. As bacteriocinas circulares (classe IIc) atuam interagindo diretamente com a membrana celular, provocando sua permeabilização. Acredita-se que o fato das bacteriocinas circulares terem forte carga positiva facilite sua interação eletrostática com a membrana bacteriana de carga negativa sem a necessidade de um receptor. As colicinas atuam interagindo com receptores específicos na superfície das células-alvo, mas têm diferentes modos de ação: (i) inibir a síntese de proteínas e/ou (ii) danos na molécula de DNA (Cotter et al., 2013; Bastos et al., 2015; Perez et al., 2018; Garcia-Gutierrez et al., 2019; Meade et al., 2020; Simons et al., 2020).

6. Identificação, purificação e caracterização das bacteriocinas

É possível obter bacteriocinas produzidas por bactérias provenientes de diversos ambientes. As bacteriocinas descobertas nos últimos anos foram isoladas principalmente de bactérias presentes em solos, alimentos fermentados, intestinos de animais e fezes humanas. Os métodos primordiais e mais utilizados para a triagem de cepas potencialmente produtoras de bacteriocinas baseiam-se na identificação da atividade antimicrobiana de seus sobrenadantes livres de células e de seus extratos purificados. Para os testes de difusão em disco ou em poços, inocula-se as cepas indicadoras no meio ágar de cultura e aplica-se nos discos ou nos poços presentes no meio os extratos purificados ou os sobrenadante obtidos por centrifugação. Para ambos métodos, a atividade antimicrobiana é avaliada pela medição da zona de inibição de crescimento em torno do ponto de aplicação da bacteriocina. Pode-se fazer também um teste de sobreposição, em que se cultiva em meio ágar de cultura a cepa produtora e, subsequentemente, sobrepõe-se ágar semi-sólido inoculado com a cepa indicadora no meio, estimando a atividade pela inibição do crescimento da cepa indicadora. Outra opção é inocular a cepa indicadora no meio líquido de cultura juntamente com o sobrenadante e avaliar o crescimento por densidade óptica. Essas técnicas apresentam limitações, já que a bactéria pode não ser capaz de crescer no meio de cultura disponível ou o crescimento *in vitro* pode não fornecer as condições

adequadas para induzir a biossíntese da bacteriocina. Contornando essas limitações, atualmente muitos estudos realizam testes de triagem *in silico* usando softwares como BAGEL e BACTIBASE, os quais permitem a identificação de *clusters* de genes de bacteriocinas putativos por meio de um banco de dados. Esses softwares escaneiam o genoma bacteriano em busca de bacteriocinas putativas derivadas de fases de leitura aberta (*open reading frames* ou “ORF”) e analisam em torno dos ORFs em busca de proteínas/enzimas putativas envolvidas na síntese, transporte e imunidade. (Collins et al., 2017; Zou et al., 2018; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

Os métodos de purificação escolhidos dependem das características moleculares da bacteriocina, como massa molecular e carga elétrica. Os principais métodos usados envolvem precipitação com sulfato de amônio, troca catiônica, cromatografia de filtração em gel (GFC) e cromatografia em fase líquida de alto desempenho (RP-HPLC) (Collins et al., 2017; Zou et al., 2018; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

A massa molecular da bacteriocina empregada para a caracterização pode ser determinada por eletroforese em gel de tricina dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida (Tricine-SDS-PAGE), dessorção a laser assistida por matriz/espectrometria de tempo de ionização de massa de voo (MALDI-TOF-MS) e espectrometria de massa por cromatografia líquida com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS). A caracterização da estabilidade térmica, enzimática e ao pH da bacteriocina é importante para assegurar sua função nas diferentes condições, como durante testes *in vitro* e *in vivo* e em circunstâncias clínicas. Para isso, os extratos purificados ou os sobrenadante são ajustados a diferentes valores de pH, tratados com diferentes enzimas e mantidos em diferentes temperaturas; em seguida, avalia-se novamente a atividade antimicrobiana da bacteriocina (Collins et al., 2017; Zou et al., 2018; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

O conjunto de todas estas características auxilia na identificação e classificação das bacterianas.

7. Atuação das bacteriocinas sobre a microbiota

A microbiota é definida como a comunidade de micro-organismos que habitam um ecossistema. Entre os micro-organismos que compõem esta comunidade, estão principalmente as bactérias, seguidas dos fungos, vírus e alguns protozoários. As

comunidades microbianas e seus metabólitos são benéficos ao hospedeiro, visto que são necessários para a homeostase imunológica e para prevenir muitas doenças ao hospedeiro. A alta densidade celular da microbiota humana resulta em contato direto entre células da mesma espécie e de espécies diferentes, estimulando interações microbianas cooperativas e antagônicas. Nesses ambientes, a produção de bacteriocinas pode fornecer um mecanismo pelo qual seus produtores obtêm uma vantagem competitiva sobre as cepas vizinhas sensíveis. Esta vantagem tem sido associada à produção de bacteriocinas e é promovida por meio de três mecanismos distintos: (i) auxiliando na colonização e sobrevivência da cepa produtora; (ii) inibindo diretamente o crescimento de cepas invasoras; e (iii) atuando como peptídeos sinalizadores (moléculas de *quorum-sensing*). Dessa forma, as bacteriocinas podem ser consideradas como elementos reguladores, que equilibram a relação entre bactérias no mesmo ambiente (Dobson et al., 2012; Hegarty et al., 2016; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

Kommineni e colaboradores (2015) desenvolveram um modelo de colonização do intestino de camundongo por *Enterococcus faecalis* para avaliar a importância do plasmídeo conjugativo pPD1 expressando a bacteriocina 21 na colonização. Após a suplementação na dieta dos camundongos com *E. faecalis* contendo pPD1, observou-se que estas cepas superaram em proporção as cepas indígenas, e que o pPD1 foi transferido por conjugação para outras cepas de *E. faecalis* no intestino. Em comparação, suplementou-se na dieta cepas de *E. faecalis* com plasmídeo pD1 não-funcional, sem expressão de bacteriocina 21, e observou-se que estas cepas não apresentaram vantagem sobre as cepas indígenas na colonização e que ainda apresentaram persistência prejudicada no trato gastrointestinal em comparação com as cepas indígenas e as cepas contendo pPD1 funcional. Os autores ressaltam que esse resultado é possivelmente devido ao fardo excessivo de manter um grande plasmídeo não-funcional. Portanto, estes achados sugerem que o plasmídeo conjugativo pPD1 expressando a bacteriocina 21 oferece ao *E. faecalis* uma colonização mais eficaz do intestino.

Umu e colaboradores (2016) examinaram os efeitos de cinco cepas diferentes produtoras de bacteriocinas, em comparação com suas cepas mutantes isogênicas não-produtoras de bacteriocinas, sobre microbiota intestinal de camundongos saudáveis. As bacteriocinas estudadas foram sakacina A, pediocina PA-1, enterocinas P, Q e L50, plantaricinas EF e JK e garvicina ML. Após a suplementação na dieta dos

camundongos com as cepas, observou-se que a estrutura geral da microbiota intestinal permaneceu praticamente inalterada, exceto pela inibição de algumas bactérias, como *Staphylococcus sp.* e *Clostridium sp.*, e pelo aumento na presença de bactérias ácido-láticas. Estes achados sugerem que várias dessas cepas produtoras de bacteriocinas têm o potencial de recompor a microbiota intestinal de forma favorável ao hospedeiro sem causar grandes perturbações.

Kim e colaboradores (2019) demonstraram que *Blautia producta* BPscsk reduz o crescimento de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE) *in vitro* e *in vivo* em camundongos pela secreção de um lantibiótico semelhante à nisina-A, embora tenha pouca atividade contra bactérias comensais intestinais. Por meio de análises de amostras fecais de pacientes submetidos a trasplantes de medula óssea, os quais correm alto risco de infecção por VRE, observou-se uma abundância significativa na expressão dos genes de lantibióticos correlacionada inversamente com a abundância relativa de VRE nas amostras.

Crowther e colaboradores (2013) induziram uma infecção por *Clostridium difficile* em um modelo de intestino *in vitro* preparado com fezes humanas e compararam a capacidade da vancomicina e da bacteriocina NVB302 em tratar a infecção separadamente. Os autores monitoraram a microbiota intestinal indígena e a presença de *C. difficile* e seus esporos e toxinas. Ambos NVB302 e vancomicina foram eficazes no tratamento da infecção simulada, sendo que NVB302 não apresentou inferioridade em relação à vancomicina e teve menos efeitos deletérios contra as cepas de *Bacteroides fragilis*.

Estudos como estes indicam que a expressão de bacteriocinas oferece a seus produtores uma vantagem competitiva sobre outras bactérias e propõem a investigação de seu uso para fins terapêuticos, visando eliminar ou inibir o crescimento de espécies patogênicas na microbiota humana.

8. Atividade das bacteriocinas sobre biofilmes

Biofilmes são comunidades sésseis de bactérias incorporadas em uma matriz polimérica extracelular, podendo ser fixadas à substratos bióticos ou abióticos. A formação de biofilme confere aos microrganismos resistência a vários fatores físico-químicos, bem como proteção contra substâncias antimicrobianas. Microrganismos que residem em biofilmes podem desenvolver tolerância a agentes antimicrobianos

por meio de dormência metabólica ou persistência molecular. Por esse motivo, as infecções envolvendo biofilmes não são facilmente tratáveis com as terapias existentes e comumente empregadas, podendo haver longos períodos de quiescência clínica (Koo et al., 2017; Mathur et al., 2018).

Novas abordagens terapêuticas de controle de biofilmes vêm sendo estudadas. Dobson e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de diferentes concentrações da lacticina 3147 sobre a formação de biofilmes e sobre biofilmes maduros de cepas de *Streptococcus mutans*. Os autores observaram que a lacticina 3147 na concentração de 6,25 µmol/L reduzia em 90% a formação de biofilme em todas as cepas testadas, aparentemente devido a uma redução no número de células e na capacidade de adesão à superfície de *S. mutans*. Entretanto, sobre biofilmes maduros a lacticina 3147 apresentou reduzida atividade. Nas cepas de *S. mutans* DPC6143 e UA159 houve uma redução de 50% nos biofilmes maduros, já sobre a cepa *S. mutans* DPC6155, a redução foi de 24%.

A atividade da piocina S2 sobre biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* foi testada por Smith e colaboradores (2012). Os autores demonstraram que a piocina S2 exibiu uma potente atividade inibitória na formação de biofilme de isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Os autores avaliaram a capacidade da piocina S2 em tratar uma infecção por *P. aeruginosa* em lagartas *Galleria mellonella*. Para isso, vinte larvas foram inoculadas com 10^4 UFC de *P. aeruginosa* YHP14 e após 3 horas injetadas com piocina S2 (27 mg/kg) ou solução salina tamponada com fosfato (grupo controle). As larvas foram monitoradas a cada 2 horas. Larvas no grupo controle morreram em 12 a 14 horas após a infecção, enquanto que aquelas tratadas com piocina S2 sobreviveram até o experimento ser interrompido em 72 horas.

Os efeitos de diferentes tipos de bacteriocinas (nisina A, lacticina Q e nukacina ISK-1) sobre biofilmes maduros de um isolado clínico de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foram avaliados por Okuda e colaboradores (2013). Entre as bacteriocinas testadas, a nisina A apresentou a maior atividade bactericida contra células planctônicas e células sésseis. A lacticina Q também mostrou atividade bactericida contra células planctônicas e células sésseis, mas sua atividade contra células sésseis foi significativamente menor do que a da nisina A. Nukacin ISK-1 mostrou atividade bacteriostática contra células planctônicas e não mostrou atividade bactericida contra células sésseis.

Saising e colaboradores (2012) investigaram o efeito da galidermina isolada de *Staphylococcus gallinarum* sobre duas cepas estafilocócicas (*S. aureus* SA113 e *Staphylococcus epidermidis* O47) formadoras de biofilme. Os autores observaram que a galidermina inibiu o crescimento de estafilococos de uma forma dependente da dose e preveniu eficientemente a formação de biofilme por ambas as cepas. No entanto, uma subpopulação de 0,1 a 1,0% de células "persistentes" de um estado genético e fisiológico desconhecido não foram afetadas pela presença da bacteriocina. Além disso, assim como muitos outros antimicrobianos testados, a galidermina mostrou atividade limitada contra células sésseis dentro de biofilmes maduros.

Gómez e colaboradores (2012) testaram a atividade da enterocina AS-48 empregada isoladamente e em combinação com biocidas (cloreto de benzalcônio, ceftriaxona, brometo de didecildimetilamônio, clorexidina, hexaclorofeno, entre outros) contra um coquetel de cepas de *Listeria monocytogenes* no estado planctônico, bem como em biofilmes formados em placas de microtitulação de poliestireno. Observou-se que os biocidas inibiram completamente o crescimento das células planctônicas de *L. monocytogenes* em concentrações 4 a 10 vezes menores do que suas concentrações inibitórias mínimas (MIC) quando em combinação com a enterocina AS-48. A enterocina AS-48 também potencializou a atividade da maioria dos biocidas contra células sésseis de *L. monocytogenes* e diminuiu a aderência e a formação de biofilme do coquetel de células em placas de microtitulação de poliestireno. Posteriormente, Gómez e colaboradores (2014) testaram a enterocina AS-48 isoladamente e em combinação com biocidas (cloreto de benzalcônio, ceftriaxona, brometo de didecildimetilamônio, clorexidina, hexaclorofeno, entre outros) contra um coquetel de seis cepas de *S. aureus* (sendo três resistentes à metilicilina) no estado planctônico e em biofilmes formados em placas de microtitulação de poliestireno. A inativação de células planctônicas por cloreto de benzalcônio, ceftriaxona e cloreto de hexadecilpiridínio aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando testados em combinação com a enterocina AS-48 (25mg/L). Contudo, não houve aumento significativo da inativação pelos outros biocidas quando combinados com a enterocina. A inativação de células sésseis por todos os biocidas testados aumentou notavelmente quando em combinação com a enterocina AS-48, especialmente quando a bacteriocina foi adicionada a 50 mg/L.

Cirkovic e colaboradores (2016) avaliaram a atividade da liqueniocina 50.2 e de um extrato de bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* BGBU1-4 contra biofilmes de estafilococos coagulase-negativos e de *L. monocytogenes*. Observou-se que a liqueniocina 50.2 em concentrações de 1/2 MIC e 1/4 MIC inibiu significativamente a formação de biofilme de todas as cepas de estafilococos coagulase-negativos. Já o extrato bruto BGBU1-4 em concentrações de 1/2 MIC e 1/4 MIC inibiu significativamente a formação de biofilme de todas as cepas de *L. monocytogenes*.

Como apresentado acima, a atividade das bacteriocinas contra biofilmes eleva ainda mais o valor biológico de várias bacteriocinas, visto que o controle de bactérias em biofilmes é muito difícil de ser feito por antibióticos convencionais (Mathur et al., 2018).

9. Potenciais aplicações terapêuticas

9.1. Aplicação como probióticos

O emprego de bacteriocinas produzidas por bactérias *in situ* como probióticos tem sido estudado como um método para modular a composição da microbiota humana e para controlar certas patologias agudas e crônicas (Garcia-Gutierrez et al., 2019).

9.1.1. Ação frente a placa dentária

Diversos estudos têm investigado formas de minimizar os efeitos negativos associados aos biofilmes de placas dentárias, principalmente sobre *S. mutans*, por meio da administração de uma cepa produtora de bacteriocina como probiótico (Mathur et al., 2018). Burton e colaboradores (2006) conduziram um estudo preliminar sobre os efeitos do probiótico *Streptococcus salivarius* K12 produtor de bacteriocinas na composição da microbiota bucal e nos parâmetros de mau odor bucal em indivíduos com halitose. Os autores concluíram que o empregado de *S. salivarius* K12 como probiótico pode fornecer uma estratégia efetiva para reduzir halitose. Posteriormente, Burton e colaboradores (2013) conduziram um ensaio randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, para determinar a influência do probiótico *S.*

salivarius M18 produtor de bacteriocinas na saúde bucal em crianças. Os autores concluíram que o probiótico *S. salivarius* M18 pode fornecer benefícios quando administrado regularmente. Recentemente, Wasfi e colaboradores (2018) investigaram os efeitos inibitórios de quatro cepas diferentes do probiótico *Lactobacillus sp.* produtor de bacteriocinas sobre a formação de biofilme dentário, *quorum sensing* e sobrevivência ao estresse de *S. mutans*. O estudo demonstrou que o probiótico *Lactobacillus sp.* pode inibir a cárie dentária ao limitar o crescimento e as propriedades de virulência do *S. mutans*.

9.1.2. Para o tratamento de otite média aguda

A otite média aguda recorrente, motivo importante do uso de antibióticos na infância, tem como principal risco a colonização da microbiota da ouvido médio e da nasofaringe por múltiplos otopatógenos bacterianos, sendo notada a ausência ou baixa abundância desses otopatógenos na microbiota de crianças sem histórico de otite média aguda. Uma vez que a antibióticoterapia recorrente pode ter consequências negativas, como promover a seleção de otopatógenos resistentes ou provocar efeitos adversos, os probióticos se apresentam como uma abordagem atraente para a prevenção da otite média aguda recorrente por meio da recomposição da microbiota do ouvido médio e da nasofaringe (Cárdenas et al., 2019).

Marchisio e colaboradores (2015) conduziram um estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, sobre a eficácia do probiótico *S. salivarius* 24SMB produtor de bacteriocinas administrado por via intranasal para a prevenção de otite média aguda em crianças com tendência à otite. Foi possível verificar neste estudo a capacidade desse probiótico em reduzir a recorrência de episódios de otite média aguda nessas crianças. Recentemente, Cárdenas e colaboradores (2019) investigaram a eficácia do probiótico *Lactobacillus salivarius* PS7 produtor de bacteriocinas na prevenção de otite média aguda recorrente em um estudo envolvendo 61 crianças que sofrem desta condição. Embora tenham reconhecido as limitações do estudo, como a falta de um grupo controle e de randomização, foi demonstrada uma redução significativa na recorrência de episódios e na necessidade de administração de antibióticos nas crianças.

9.1.3. No tratamento de transtornos do trato gastrointestinal

Uma vez que perturbações no equilíbrio da microbiota intestinal estão sendo associadas a várias doenças agudas e crônicas, a aplicação racional de probióticos produtores de bacteriocina tem sido estudada como um método para modular a estrutura e função da microbiota intestinal (Garcia-Gutierrez et al., 2019). Foi demonstrado por Niedzielin e colaboradores (2001) em um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo que o probiótico *Lactobacillus plantarum* 299V produtor de bacteriocinas apresentou um efeito benéfico para indivíduos com síndrome do intestino irritável. Em 2008, Gotteland e colaboradores conduziram um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, para avaliar os efeitos da ingestão regular de suco de cranberry e do probiótico *Lactobacillus johnsonii* La1 produtor de bacteriocinas em crianças colonizadas por *Helicobacter pylori*. Os resultados deste estudo sugerem que a ingestão regular de ambos seja benéfico em crianças assintomáticas colonizadas por *H. pylori*, visto que a combinação foi capaz de inibir a colonização desta bactéria no trato gastrointestinal.

9.1.4. Prevenção da colonização por *Streptococcus agalactiae* do trato vaginal

O *Streptococcus agalactiae* coloniza o trato vaginal de uma grande porcentagem de mulheres grávidas e, embora a triagem e a profilaxia antibiótica sejam rotineiramente realizadas nesses casos, esta bactéria continua sendo uma importante causa de infecção neonatal grave quando transmitida durante o parto (Patras et al., 2015). Patras e colaboradores (2015) investigaram a capacidade do probiótico *S.salivarius* K12 produtor de bacteriocinas de inibir a colonização por *S. agalactiae* do trato vaginal, e seus resultados sugerem que este probiótico tenha potencial como terapia preventiva ao inibir a colonização vaginal de *S. agalactiae*, evitando sua transmissão ao neonato.

9.1.5. Considerações sobre o uso de probióticos de cepa produtora de bacteriocina

Ao projetar o desenvolvimento de probióticos de cepa produtora de bacteriocina, deve-se considerar que, para garantir sua eficácia, a cepa produtora precisa sobreviver e colonizar a microbiota humana e a bacteriocina precisa estar ativa neste ambiente. Além disso, deve-se considerar que as bacteriocinas ativamente produzidas *in vitro* não serão necessariamente produzidas *in vivo*, ou podem não ser produzidas em quantidades suficientemente altas. Isto é esperado, pois vários fatores ambientais podem afetar a produção ou a atividade das bacteriocinas *in vivo*, tais como a competição de nicho entre as bactérias, a presença de outras substâncias antimicrobianas e as respostas do hospedeiro. Deve-se também ficar atento ao fato de que a produção das bacteriocinas pode ser dependente de estímulos ambientais, como, por exemplo peptídeos sinalizadores (Dobson et al., 2012; Umu et al., 2016; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

9.2. Terapia combinada de bacteriocinas com antimicrobianos convencionais

Os tratamentos que exploram as interações sinérgicas entre os antimicrobianos convencionais e as bacteriocinas têm se mostrado muito promissores. Acredita-se que o uso de combinações de antimicrobianos e bacteriocinas pode acelerar o tempo de tratamento, diminuir a concentração de antimicrobiano necessária e reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência ao antimicrobiano ou à bacteriocina. As combinações podem ser formuladas a fim de aumentar a eficácia do tratamento contra alvos inicialmente pouco sensíveis. Diversos autores relataram combinações de bacteriocina-antimicrobiano eficazes contra biofilmes; assim, essas combinações podem ser opções úteis no tratamento de infecções por bactérias de importância clínica, como MRSA, *P. aeruginosa*, *Gardnerella vaginalis* e *S. mutans* (Cavera et al., 2015; Mathur et al., 2017; Mathur et al., 2018).

9.2.1. Nisina associada a antimicrobianos

Nas últimas décadas, a nisina tem sido muito utilizada como um biopreservativo alimentar, entretanto seu uso como antimicrobiano na área clínica vem sendo avaliado. Brumfitt e colaboradores (2002) avaliaram a atividade *in vitro* da nisina sozinha e combinada com bacitracina, ramoplanina e cloranfenicol contra MRSA e VRE. Observou-se que a nisina agiu sinergicamente com a ramoplanina e foi ligeiramente mais ativa contra VRE do que contra MRSA. No entanto, para algumas cepas, a atividade da nisina foi antagonizada pelo cloranfenicol e por baixas concentrações de ramoplanina. A atividade *in vitro* de 18 antimicrobianos diferentes em combinação com a nisina foi testada contra cepas de *Enterococcus faecalis* por Tong e colaboradores (2014). Dentre os 18 antimicrobianos testados, a combinação da nisina com penicilina, ciprofloxacina e cloranfenicol apresentou atividade antibiofilme mais forte, quando comparada com as atividades dos antimicrobianos isoladamente.

A capacidade da nisina e seus derivados em potencializar o efeito de antibióticos convencionais e a sua possibilidade de erradicar células associadas a biofilme de uma variedade de cepas estafilocócicas foi avaliada por Field e colaboradores (2016) (a). Os autores observaram que as combinações dos derivados nisina V com penicilina ou nisina I4V com cloranfenicol tiveram um efeito inibitório sinergicamente aumentado contra cepas de *S. aureus* SA113 e *S. pseudintermedius* DSM21284 e contra a formação de biofilme. Posteriormente, Field e colaboradores (2016) (b) avaliaram o potencial *in vitro* da nisina em aumentar a eficácia dos antibióticos polimixina e colistina contra cepas de *P. aeruginosa* formadora de biofilme. Observou-se que as concentrações de polimixinas necessárias para inibir efetivamente a formação de biofilme podem ser drasticamente reduzidas quando em combinação com nisina.

9.2.2. Outras bacteriocinas associadas a antimicrobianos

Alem da nisina, outros estudos têm sido realizados para avaliar o efeito da combinação de outras bacteriocinas com antimicrobianos no controle de infecções e formação de biofilmes. Noll e colaboradores (2012) avaliaram o potencial *in vitro* da subtilosina em inibir *G. vaginalis* sozinha e em combinação com os agentes

antimicrobianos naturais monolaurato de glicerol, arginato láurico e ϵ -poli-L-lisina. Observou-se que a subtilosina atuou sinergicamente com todos os antimicrobianos naturais escolhidos. Outro estudo conduzido por Draper e colaboradores (2013) avaliou a atividade *in vitro* da lacticina 3147 combinada com diferentes antibióticos empregados para controlar cepas Gram-positivas e Gram-negativas. A polimixina B e a polimixina E (colistina) exibiram atividade sinérgica com a lacticina 3147, principalmente contra cepas Gram-negativas.

Ainda em 2013, Naghmouchi e colaboradores avaliaram a atividade *in vitro* de colistina (polimixina E) quando combinada com nisina e pediocina PA-1/AcH. Os autores observaram efeitos sinérgicos entre as moléculas contra cepas Gram-negativas, incluindo *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 e *E. coli* ATCC 35150. A cepa mais sensível à colistina foi a *E. coli* enterohemorrágica O157: H7, a qual foi inibida a 0,12 $\mu\text{g} / \text{ml}$ e então a 0,01 e 0,03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ quando a colistina foi combinada com a nisina A (1,70 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e com a pediocina PA-1/AcH (1,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$), respectivamente.

Recentemente, Aguilar-Pérez e colaboradores (2018) avaliaram a atividade *in vitro* da enterocina AS-48 sozinha e em combinação o etambutol empregado para o controle de *Mycobacterium tuberculosis*. A combinação mostrou ser muito eficaz, pois foi capaz de interagir sinergicamente com o etambutol e inibir o *M. tuberculosis* extracelular e no interior de macrófagos infectados. Também em 2018, Chi e Holo avaliaram o espectro de atividade da garvicina KS e observaram que ela apresenta um amplo espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas e *Acinetobacter spp.*, mas um espectro inibitório estreito contra outras bactérias Gram-negativas. Além disso, a garvicina KS interagiu sinergicamente com a polimixina B contra *Acinetobacter spp.* e *E. coli*. Quando em combinação com nisina e polimixina B, garvicina KS causou a erradicação rápida e completa de *Acinetobacter spp.* e de *E. coli*; já em combinação com nisina e farnesol, causou a erradicação rápida e completa de todas as cepas testadas de *S. aureus*.

9.2.3. Considerações sobre a combinação bacteriocinas e antimicrobianos

Há um grande número de combinações bacteriocina-antimicrobiano que ainda não foi investigado. A natureza das interações entre uma bacteriocina e um

antimicrobiano convencional deve ser considerada para obter combinações eficazes *in vivo*. A falta de uma compreensão precisa dessas interações tem impedido o progresso no emprego dessas combinações na terapia (Mathur et al., 2017).

10. Resistência bacteriana frente às bacteriocinas

As bacteriocinas ainda não foram empregadas extensivamente em circunstâncias clínicas, então a compreensão das possíveis complicações, como o aparecimento de cepas resistentes, é baseada principalmente em pesquisas laboratoriais (Cotter et al., 2013).

10.1. Resistência inata

A resistência inata de uma cepa pode resultar da produção endógena de enzimas que degradam bacteriocinas específicas. Este é o caso, por exemplo, das cepas produtoras de nisinase, enzima degradadora de nisina, a qual confere às cepas resistência à nisina. Algumas cepas não-produtoras de bacteriocinas possuem resistência inata a certas bacteriocinas por meio de mimetismo imunológico, ou seja, por possuírem genes que codificam proteínas homólogas aos sistemas de imunidade de cepas produtoras. Uma cepa pode também ser resistente a uma bacteriocina por consequência de produzir uma bacteriocina homóloga a esta (Cotter et al., 2013; Bastos et al., 2015; Draper et al., 2015). Os ácidos teicóicos (TAs) e ácidos lipoteicóicos (LTAs), constituintes da parede celular de bactérias Gram-positivas, possuem um esqueleto composto por grupos fosfato desprotonizados, o que confere à parede uma carga elétrica negativa. A esterificação desse esqueleto com D-alanina resulta na incorporação de grupos amino carregados positivamente à parede celular, reduzindo sua carga negativa. Mutações nos genes do operon *dlt*, o qual codifica as proteínas necessária para a incorporação de D-alanina a TAs e LTAs, tornam esse processo defeituoso e geram, conseqüentemente, alterações na carga elétrica da parede da célula. Muitas bacteriocinas têm propriedades catiônicas que às conferem alta afinidade pela parede celular bacteriana aniônica; entretanto, alterações nessa carga elétrica, como as provocadas por mutações no operon *dlt*, geram repulsão eletrostática entre as bacteriocinas e o envelope de células-alvo. O envolvimento do operon *dlt* na resistência inata a bacteriocinas foi comprovado experimentalmente

para diferentes espécies Gram-positivas, como *S. aureus*, *C. difficile* e *Bacillus cereus*, entre outras (Bastos et al., 2015; Draper et al., 2015).

10.2. Resistência adquirida às bacteriocinas

Os mecanismos responsáveis pela resistência adquirida às bacteriocinas variam entre as espécies bacterianas. Em muitos microrganismos investigados, o fenótipo de resistência foi associado a modificações da parede celular, como: redução da carga negativa pelo aumento de D-alanina nos LTAs e TAs, alterações nas cadeias laterais de aminoácidos, alterações nas pontes cruzadas peptídicas, e aumento da espessura da parede celular. Essas alterações podem prejudicar a capacidade da bacteriocina de interagir com a parede celular. O fenótipo de resistência também foi associado a modificações da membrana citoplasmática, como alterações na composição fosfolipídica ou na proporção de ácidos graxos insaturados:saturados. Essas alterações podem resultar em uma membrana citoplasmática mais ou menos fluida ou em uma bicamada lipídica de carga elétrica diferente, o que pode prejudicar a capacidade da bacteriocina de interagir com a membrana. É importante observar que a resistência a bacteriocinas tipo-pediocina cujo alvo é o Man-PTS ocorre devido a ausência ou redução da expressão das proteínas receptoras de membranas. Alguns estudos correlacionaram resistência a antibióticos com aumento na expressão de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs). Acredita-se que o aumento da expressão de PBPs reduza a acessibilidade ao Lipídio II pelas bacteriocinas ao ocultá-lo e ao diminuir sua concentração extracelular (Cotter et al., 2013; Bastos et al., 2015; Draper et al., 2015).

11. Vantagens e desvantagens do emprego das bacteriocinas como agentes terapêuticos

11.1. Vantagens

Uma das principais vantagens das bacteriocinas é sua natureza de síntese ribossômica, o que as torna passíveis de estratégias de bioengenharia. Estas estratégias poderiam ser empregadas para modular o funcionamento e melhorar as propriedades físico-químicas das bacteriocinas, com intenção de aumentar sua

bioatividade e biodisponibilidade. Bacteriocinas geralmente exibem níveis relativamente baixos de citotoxicidade para tecidos humanos e animais. Outra vantagem é a disponibilidade de bacteriocinas com espectros de ação diversos. As bacteriocinas que exibem atividade antimicrobiana de espectro estreito nos permitiriam atingir micro-organismos patogênicos de maneira específica sem causar grande dano à microbiota humana, contribuindo para manter um equilíbrio nas populações microbianas e evitando complicações associadas ao tratamento, enquanto que as bacteriocinas que exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro nos permitiriam tratar empiricamente infecções de etiologia desconhecida (Cotter et al., 2013; Mathur et al., 2017; Mathur et al., 2018).

11.2. Desvantagens

Uma desvantagem do uso de bacteriocinas na terapia é a dificuldade de sua administração por via oral, devido à possibilidade de serem degradados por proteases digestivas no intestino. No entanto, isso pode ser contornado por tecnologias de encapsulamento ou por administração por via parenteral. Igualmente pode-se levar em consideração técnicas de bioengenharia que aumentem a resistência desses peptídeos frente às proteases. Assim como os antimicrobianos convencionais, o uso excessivo de bacteriocinas pode levar a patógenos resistentes. Uma abordagem para evitar o surgimento de bactérias resistentes é o uso combinado de bacteriocinas com diferentes mecanismos de ação, o que permitiria a administração de doses menores. Outra abordagem é a combinação de antimicrobianos convencionais e bacteriocinas com diferentes mecanismos de ação, visto que o desenvolvimento de resistência cruzada é menos provável. Entretanto, como a resistência a uma determinada bacteriocina pode se estender a outras bacteriocinas, principalmente da mesma subclasse, é aconselhável que as combinações sejam testadas com o objetivo de investigar o desenvolvimento de resistência cruzada (Cavera et al., 2015; Bastos et al., 2015; Mathur et al., 2017).

11.3. Desafios do uso das bacteriocinas na terapia

Fatores críticos para aumentar o potencial sucesso na terapia das bacteriocinas incluem melhorar a nossa compreensão de seus mecanismos de ação e de suas

características farmacodinâmicas e farmacocinéticas, elaborar estratégias para evitar o desenvolvimento de resistência, e desenvolver um método padronizado de avaliação da atividade antimicrobiana *in vivo*, uma vez que as variações nos modelos animais e nos métodos de análise tornam problemática a comparação direta de dados de diferentes laboratórios. Acredita-se que aumentar nossa compreensão do ambiente onde as bactérias crescem e as diferentes interações microbianas existentes, irá nos proporcionar mais informações importantes a respeito desses peptídeos (Dobson et al., 2012; Cotter et al., 2013; Mathur et al., 2017; Garcia-Gutierrez et al., 2019).

12. Conclusão

Estudos realizados nas últimas décadas vêm demonstrando a influência favorável das bacteriocinas na capacidade de colonização e sobrevivência de suas cepas produtoras. O emprego de bacteriocinas produzidas por bactérias *in situ* como probióticos para modular a composição da microbiota humana, visando eliminar ou inibir o crescimento de cepas patogênicas, tem se mostrado promissor. Além disso, considera-se a possibilidade de combater bactérias patogênicas por meio de combinações de bacteriocinas com antimicrobianos convencionais que apresentem atividade sinérgica. Embora essas abordagens por si só não resolvam o problema cada vez mais preocupante da resistência bacteriana aos antibióticos, ambas têm sido exploradas e demonstrado resultados bastante promissores.

13. Referências bibliográficas

Aguilar-Pérez C, Gracia B, Rodrigues L, et al. Synergy between Circular Bacteriocin AS-48 and Ethambutol against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(9):e00359-18. Published 2018 Aug 27. doi:10.1128/AAC.00359-18

Bastos Mdo C, Coelho ML, Santos OC. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading).* 2015;161(Pt 4):683-700. doi:10.1099/mic.0.082289-0

Brumfitt, W., Salton, M. R. & Hamilton-Miller, J. M. Nisin, alone and combined with peptidoglycan- modulating antibiotics: activity against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin- resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 731–734 (2002).

Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol.* 2006;100(4):754-764. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02837.x

Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, et al. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 6):875-884. doi:10.1099/jmm.0.056663-0

Cárdenas N, Martín V, Arroyo R, et al. Prevention of Recurrent Acute Otitis Media in Children Through the Use of *Lactobacillus salivarius* PS7, a Target-Specific Probiotic Strain. *Nutrients.* 2019;11(2):376. Published 2019 Feb 12. doi:10.3390/nu11020376

Cavera VL, Arthur TD, Kashtanov D, Chikindas ML. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(5):494-501. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011

Chi H, Holo H. Synergistic Antimicrobial Activity Between the Broad Spectrum Bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Curr Microbiol.* 2018;75(3):272-277. doi:10.1007/s00284-017-1375-y

Cirkovic I, Bozic DD, Draganic V, et al. Licheniocin 50.2 and Bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 Inhibit Biofilms of Coagulase Negative Staphylococci and *Listeria monocytogenes* Clinical Isolates. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167995. Published 2016 Dec 8. doi:10.1371/journal.pone.0167995

Collins FWJ, O'Connor PM, O'Sullivan O, et al. Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete Lactobacillus Pan-genome. *Sci Rep.* 2017;7(1):3481. Published 2017 Jun 14. doi:10.1038/s41598-017-03339-y

Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(10):777-788. doi:10.1038/nrmicro1273

Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(2):95-105. doi:10.1038/nrmicro2937

Crowther,G.S.;Baines,S.D.;Todhunter,S.L.;Freeman,J.;Chilton,C.H.;Wilcox,M.H.Evaluation of NVB302 versus vancomycin activity in an in vitro human gut model of Clostridium difficile infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, 68, 168–176.

Draper, L.A., Cotter, P.D., Hill, C. *et al.* The two peptide lantibiotic lactacin 3147 acts synergistically with polymyxin to inhibit Gram negative bacteria. *BMC Microbiol.* 2013;13, 212. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-212>

Draper LA, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Lantibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;79(2):171-191. doi:10.1128/MMBR.00051-14

Dobson A, O'Connor PM, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Impact of the broad-spectrum antimicrobial peptide, lactacin 3147, on Streptococcus mutans growing in a biofilm and in human saliva. *J Appl Microbiol.* 2011;111(6):1515-1523. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05153.x

Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production: a probiotic trait?. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(1):1-6. doi:10.1128/AEM.05576-11

Field D, O'Connor R, Cotter PD, Ross RP, Hill C. In Vitro Activities of Nisin and Nisin Derivatives Alone and In Combination with Antibiotics against Staphylococcus Biofilms. *Front Microbiol.* 2016;7:508. Published 2016 Apr 18. doi:10.3389/fmicb.2016.00508

Field D, Seisling N, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Synergistic Nisin-Polymyxin Combinations for the Control of *Pseudomonas* Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2016;7:1713. Published 2016 Oct 26. doi:10.3389/fmicb.2016.01713

Gálvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol.* 2007;120(1-2):51-70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001

Garcia-Gutierrez E, Mayer MJ, Cotter PD, Narbad A. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes.* 2019;10(1):1-21. doi:10.1080/19490976.2018.1455790

Gómez NC, Abriouel H, Grande MA, Pulido RP, Gálvez A. Effect of enterocin AS-48 in combination with biocides on planktonic and sessile *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2012;30(1):51-58. doi:10.1016/j.fm.2011.12.013

Gómez NC, Abriouel H, Grande MJ, Pérez Pulido R, Gálvez A. Combined treatments of enterocin AS-48 with biocides to improve the inactivation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* planktonic and sessile cells. *Int J Food Microbiol.* 2013;163(2-3):96-100. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.018

Gotteland M, Andrews M, Toledo M, et al. Modulation of *Helicobacter pylori* colonization with cranberry juice and *Lactobacillus johnsonii* La1 in children. *Nutrition.* 2008;24(5):421-426. doi:10.1016/j.nut.2008.01.007

Grande Burgos MJ, Pulido RP, Del Carmen López Aguayo M, Gálvez A, Lucas R. The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *Int J Mol Sci.* 2014;15(12):22706-22727. Published 2014 Dec 8. doi:10.3390/ijms151222706

Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol.* 2012;113(4):723-736. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x

Hegarty JW, Guinane CM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait?. *F1000Res*. 2016;5:2587. Published 2016 Oct 27. doi:10.12688/f1000research.9615.1

Heng N, Tagg J. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4: 160. doi: 10.1038/nrmicro1273-c1

Kamiya RU, Taiete T, Gonçalves RB. Mutacins of *Streptococcus mutans*. *Braz J Microbiol*. 2011;42(4):1248-1258. doi:10.1590/S1517-83822011000400001

Kim, SG, Becattini, S, Moody, TU. *et al.* Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature*. 2019; 572, 665–669. doi: 10.1038/s41586-019-1501-z

Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 1993;12(1-3):39-85. doi:10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x

Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, *et al.*: Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*. 2015; 526(7575): 719–22.

Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(12):740-755. doi:10.1038/nrmicro.2017.99

Marchisio P, Santagati M, Scillato M, *et al.* *Streptococcus salivarius* 24SMB administered by nasal spray for the prevention of acute otitis media in otitis-prone children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(12):2377-2383. doi:10.1007/s10096-015-2491-x

Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front Microbiol*. 2017;8:1205. Published 2017 Jun 29. doi:10.3389/fmicb.2017.01205

Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2018;4:9. Published 2018 Apr 19. doi:10.1038/s41522-018-0053-6

Meade E, Slattery MA, Garvey M. Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile?. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(1):32. Published 2020 Jan 16. doi:10.3390/antibiotics9010032

Naghmouchi K, Baah J, Hober D, et al. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(6):2719-2725. doi:10.1128/AAC.02328-12

Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(10):1143-1147. doi:10.1097/00042737-200110000-00004

Noll KS, Prichard MN, Khaykin A, Sinko PJ, Chikindas ML. The natural antimicrobial peptide subtilisin acts synergistically with glycerol monolaurate, lauric arginate, and ϵ -poly-L-lysine against bacterial vaginosis-associated pathogens but not human lactobacilli. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):1756-1761. doi:10.1128/AAC.05861-11

Ogaki MB, Furlaneto MC, Maia LC. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2015;18(4), 267-276. doi.: 10.1590/1981-6723.2215

Okuda K, Zendo T, Sugimoto S, et al. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5572-5579. doi:10.1128/AAC.00888-13.

Patras KA, Wescombe PA, Rösler B, Hale JD, Tagg JR, Doran KS. Streptococcus salivarius K12 Limits Group B Streptococcus Vaginal Colonization. *Infect Immun*. 2015;83(9):3438-3444. doi:10.1128/IAI.00409-15

Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact*. 2014;13 Suppl 1(Suppl 1):S3. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3

Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. *Front Microbiol*. 2018;9:2085. Published 2018 Sep 4. doi:10.3389/fmicb.2018.02085

Reeves, PR. The bacteriocins. *Bacteriol Rev*. 1965;29(1):24-45.

Rodríguez JM, Martínez MI, Kok J. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002;42(2):91-121. doi:10.1080/10408690290825475

Saising J, Dube L, Ziebandt AK, Voravuthikunchai SP, Nega M, Götz F. Activity of gallidermin on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):5804-5810. doi:10.1128/AAC.01296-12

Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol*. 2016;120(6):1449-1465. doi:10.1111/jam.13033

Simons A, Alhanout K, Duval RE. Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*. 2020;8(5):639. Published 2020 Apr 27. doi:10.3390/microorganisms8050639

Smith K, Martin L, Rinaldi A, Rajendran R, Ramage G, Walker D. Activity of pyocin S2 against Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(3):1599-1601. doi:10.1128/AAC.05714-11

Suda S, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Lacticin 3147--biosynthesis, molecular analysis, immunity, bioengineering and applications. *Curr Protein Pept Sci.* 2012;13(3):193-204. doi:10.2174/138920312800785021

Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One.* 2014;9(2):e89209. Published 2014 Feb 20. doi:10.1371/journal.pone.0089209

Umu ÖC, Bäuerl C, Oostindjer M, et al. The Potential of Class II Bacteriocins to Modify Gut Microbiota to Improve Host Health. *PLoS One.* 2016;11(10):e0164036. Published 2016 Oct 3. doi:10.1371/journal.pone.0164036

Wasfi R, Abd El-Rahman OA, Zafer MM, Ashour HM. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1972-1983. doi:10.1111/jcmm.13496

Zou J, Jiang H, Cheng H, Fang J, Huang G. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol.* 2018;117:781-789. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233