BRUNA SOUZA DA SILVA

**PROSPECÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS SINTETIZADAS POR
*Lactobacillus acidophilus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2019

RESUMO

SILVA, BS. **Prospecção de moléculas bioativas sintetizadas por *Lactobacillus acidophilus***. 2019. 85f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Os *Lactobacillus acidophilus* são um grupo de bactérias Gram-positivas intimamente associadas, que se distribuem por diversos ambientes e possuem relevância para o ser humano, pois são componentes da microbiota normal de seus tratos gastrointestinal e urogenital. São classificados como bactérias ácido-láticas (BAL) devido à produção de ácido lático. Contudo, outro composto sintetizado por estes procariontes tem se destacado nas últimas décadas: as bacteriocinas. Bacteriocinas são peptídeos e proteínas, produzidos por bactérias, capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos, para fins de competição por recursos do ambiente. Devido ao uso indiscriminado dos antibióticos convencionais e ao surgimento das bactérias multirresistentes, as bacteriocinas tem se tornado uma opção no tratamento de infecções, confecção de produtos probióticos e na conservação de alimentos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar peptídeos antimicrobianos produzidos por *Lactobacillus acidophilus*. As amostras foram obtidas do sobrenadante de extratos ácidos dos *Lactobacillus* e submetidas a um pré-fracionamento em colunas SEP-PAK C18 descartáveis e em seguida, à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As frações coletadas foram utilizadas em ensaios de inibição do crescimento microbiano em meio líquido. Foram obtidas oito frações com atividade antimicrobiana. Duas delas, com massas moleculares de 1788 e 1074 Da, foram selecionadas para a caracterização por apresentarem atividade contra *C. albicans* e por seus melhores resultados nas análises bioinformáticas. A molécula de 1788 Da foi sequenciada, denominada Doderlina e sintetizada com o intuito de ampliar os estudos sobre seu potencial biológico. Peptídeos bioativos e bacteriocinas isolados de *L. acidophilus* já foram descritos em outros estudos, contudo até o presente momento, não foi encontrado na literatura nenhum outro relato de peptídeos bioativos de *L. acidophilus* que fossem eficazes contra *C. albicans* como encontrado neste estudo, indicando que estas bactérias podem contribuir com o tratamento da candidíase, que não está sob controle e tende a aumentar sua prevalência na população.

Palavras- chave: *Lactobacillus acidophilus*. Bacilos de Doderlein. Bacteriocinas. Peptídeos antimicrobianos. Bactérias ácido-láticas.

ABSTRACT

SILVA, BS. **Prospecting bioactive molecules synthesized by *Lactobacillus acidophilus***. 2019. Dissertation (Master thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Lactobacillus acidophilus is a group of closely associated Gram-positive bacteria that are distributed in various environments and have relevance to humans, as they are components of the normal microbiota of their gastrointestinal and urogenital tract. They are classified as lactic acid bacteria (BAL) due to the production of lactic acid. However another compound synthesized by these prokaryotes has stood out in recent decades: bacteriocins. Bacteriocins are peptides and proteins produced by bacteria capable of inhibiting the growth of other microorganisms for the purpose of competition for environmental resources. Due to the indiscriminate use of conventional antibiotics and the emergence of multi-resistant bacteria, bacteriocins have become an option in treating infections, probiotic products confection and food conservation. Thus, the present study aimed to isolate and characterize antimicrobial peptides produced by *Lactobacillus acidophilus*. Samples were obtained from *Lactobacillus acidophilus* extract supernatant and pre-fractionated on disposable SEP-PAK C18 columns and then by high performance liquid chromatography (HPLC). The collected fractions were used in microbial growth inhibition assays in liquid medium. Eight fractions with antimicrobial activity were obtained. Two of them with molecular masses of 1788 and 1074 Da were selected for characterization because they showed activity against *C. albicans* and for their best results in bioinformatics analysis. The 1788 Da molecule was sequenced, named Doderlin and synthesized in order to expand the studies on its biological potential. Bioactive peptides and bacteriocins isolated from *L. acidophilus* have already been described in other studies, however to date no other reports of *L. acidophilus* bioactive peptides that were effective against *C. albicans* as was found in this study have been found in the literature, indicating that these bacteria may contribute to the treatment of candidiasis that is not under control and increases its prevalence in the population.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*. Doderlein's bacilli. Bacteriocins. Antimicrobial peptides. Lactic acid bacteria.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias ácido-lácticas (BAL)

As bactérias ácido-lácticas (BAL) são um grupo muito diverso de bactérias fermentadoras Gram-positivas que apresentam como características típicas: formato de cocos ou bacilos, catalase negativas, anaeróbicas aerotolerantes, não formadoras de esporos, desprovidas de estruturas de locomoção e citocromos (AXELSSON, 2004). Elas são classificadas metabolicamente como seres quimio-organotróficos, com necessidades nutricionais complexas e capacidade biossintética limitada, requerindo fontes contínuas de bases nitrogenadas, vitaminas e aminoácidos (CABALLERO; TRUGO; FINGLAS, 2003; MASOOD et al., 2011)

O termo bactéria ácido-láctica faz referência ao principal produto final da fermentação desses organismos: o ácido-láctico (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). A produção deste ácido a partir do processo de fermentação permite dividir as BAL em dois grandes grupos: homofermentativas e heterofermentativas.

As homofermentativas são assim denominadas, pois mais de 95% dos metabólitos de sua fermentação resultam em ácido láctico, enquanto nas heterofermentativas, há produção de ácido acético, etanol e dióxido de carbono, além do ácido láctico (CABALLERO; TRUGO; FINGLAS, 2003). Esta definição com base na fermentação, porém, é bastante subjetiva, sendo mais biológica do que taxonômica (MAKAROVA; KOONIN, 2007).

Além do tipo de fermentação, outras características morfológicas e fisiológicas como crescimento em diferentes temperaturas, pH, fermentação de carboidratos, entre outras, são bastante empregadas na determinação taxonômica destas bactérias, uma vez que a única característica que une todo o grupo é o fato de serem todas Gram-positivas (AXELSSON, 2004).

Historicamente, a classificação destes microrganismos sofreu muitas modificações ao longo do tempo, justamente pelo fato de as BAL não pertencerem a um grupo monofilético. Em 1919, Orla-Jensen identificou os gêneros "*Betabacterium*", "*Betacoccus*", "*Microbacterium*", "*Streptobacterium*", "*Streptococcus*", "*Tetracoccus*" e "*Thermobacterium*" como pertencentes às BAL, dos quais somente *Streptococcus* permanece válido atualmente. Estudos posteriores designaram para o grupo os seguintes gêneros: *Lactobacillus* ("*Betabacterium*", "*Streptobacterium*" e

"*Thermobacterium*" incluídos como subgêneros), *Leuconostoc* ("*Betacoccus*"), *Pediococcus* ("*Tetracoccus*") e *Streptococcus*. Esta divisão persistiu até o desenvolvimento da taxonomia molecular nos anos 70 e 80, resultando em novas subdivisões destes gêneros e na inclusão de novos gêneros (PRIEST; GOODFELLOW, 2000).

A partir da década de 90, análises químicas, genéticas e filogenéticas definiram como pertencentes ao grupo das BAL os gêneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (SCHLEIFER; LUDWIG, 1995)

Baseado em dados biomoleculares, produzidos a partir do sequenciamento de RNAr 16S e 23S, as bactérias Gram-positivas se ramificam em dois filos: Firmicutes e Actinobacteria (SCHLEIFER; LUDWIG, 1995). O filo Firmicutes, antigamente denominado *Clostridium*, é composto por bactérias que apresentam baixo conteúdo de guanina-citosina (G+C), ou seja, menos de 50 mol%. Já o filo Actinobacteria é composto por bactérias com alto conteúdo G+C, (mais de 50 mol%), conforme árvore filogenética da Figura 1.

O grupo das BAL abriga tanto microrganismos patogênicos, como diversas espécies de *Streptococcus*, quanto não patogênicos como os *Lactobacillus* (YOTHER et al., 2002). Estas bactérias são naturalmente encontradas em ambientes ricos em nutrientes, o que inclui alimentos como leite e produtos lácteos, fermentados (carne, vegetais e bebidas), bem como associadas a plantas e mamíferos, incluindo humanos (AXELSSON, 2004; HAMMES; HERTEL, 2006).

As BAL compõem um dos grupos mais numerosos de bactérias associadas aos humanos como membros de sua microbiota normal, aderindo à superfície da mucosa oral e dos tratos gastrointestinal e urogenital (AXELSSON, 2004; WOOD; WARNER, 2003).

As bactérias responsáveis por promover melhorias na saúde são conhecidas como agentes probióticos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002), probióticos são classificados como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro".

Dentre os benefícios do uso de probióticos estão o auxílio na prevenção de diarreia, doenças infecciosas e úlceras estomacais, diminuição da intolerância à lactose e alergias, estimulação da imunidade intestinal e sistêmica, atividade antimicrobiana, ação inibitória contra alguns tipos de cânceres e controle dos níveis de colesterol (GILLILAND, 1990; MASOOD et al., 2011; VUYST; VANDAMME, 1994).

Figura 1 – Árvore filogenética das bactérias Gram-Positivas.

Árvore filogenética gerada a partir de análises de RNAr 16S e 23S separando as bactérias em dois filos: Firmicutes, composto bactérias que apresentam baixo conteúdo de guanina-citosina (G+C), e Actinobacteria, composto por bactérias com alto conteúdo G+C (mais de 50mol %). A barra indica 10% de divergência na sequência esperada. Fonte: Adaptado de Schleifer; Ludwig (1995).

Como mencionado anteriormente, a indústria alimentícia emprega amplamente as BAL em diversos produtos, visto que estes microrganismos desempenham um papel crucial na fermentação, contribuindo com o sabor, aroma, textura e na biopreservação dos alimentos, dominando a microbiota local durante o armazenamento e eliminando patógenos (TRIAS et al., 2008; VUYST; VANDAMME,

1994). Dentre os gêneros mais utilizados comercialmente está o gênero *Lactobacillus*, que são extremamente relevantes na indústria alimentícia em processos fermentativos e, portanto, essenciais para a fabricação de diversos produtos fermentados (SOZZI et al., 1981).

1.2 O gênero *Lactobacillus* e os *Lactobacillus acidophilus*

O gênero *Lactobacillus* é o maior e mais diverso do grupo das BAL, apresentando mais de 200 espécies e subespécies descritas, as quais se distribuem pelos mais variados habitats, sendo afetadas por condições ambientais como o valor do pH, a disponibilidade de oxigênio, o nível de substratos específicos, as secreções do ambiente em que vive e interações com outros microrganismos (GOLDSTEIN; TYRRELL; CITRON, 2015; SALVETTI; TORRIANI; FELIS, 2012; ZOETENDAL; VAUGHAN; DE VOS, 2006).

As características morfológicas e fisiológicas dos *Lactobacillus* são as mesmas já mencionadas anteriormente sobre as BAL: bactérias Gram-positivas em forma de bacilos ou cocobacilos, aerotolerantes, não formadoras de esporos, catalase negativas e produtoras de ácido láctico (Figura 2).

Figura 2- Microfotografia de *L. acidophilus*.

Cultura de *Lactobacillus acidophilus* em meio de cultura MRS "broth", mostrando sua aparência de bacilo, organizados unidades ou pares, medindo de 0,6-0,9 x 1,5-6 µm. Fonte: (CABALLERO; TRUGO; FINGLAS, 2003).

Se por um lado, a morfofisiologia destas bactérias se mostra muito bem definida, do ponto de vista taxonômico há uma constante reclassificação ocasionada pelo surgimento de novas ferramentas taxonômicas, uma vez que o grupo possui um alto grau de diversidade e complexidade filogenética (GOLDSTEIN et al., 2015; SALVETTI et al., 2012).

Os *Lactobacillus* são os microrganismos mais estudados dentre as BAL devido à sua grande relevância na indústria alimentícia, pois auxiliam na conservação dos alimentos por meio da produção de diversos compostos antimicrobianos e inoculação como bactérias iniciadoras da fermentação, as chamadas culturas “*starters*” (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010). Além disso, estes microrganismos possuem um grande potencial terapêutico e profilático sob a forma de probióticos alimentícios ou medicamentos para humanos e outros animais (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

De fato, muitos representantes desse táxon são reconhecidamente benéficos ao homem, possuindo a reputação de promotores da saúde por sua atuação na manutenção e equilíbrio da microbiota normal, impedindo assim, a infecção e proliferação por agentes patogênicos (CHARTERIS et al., 2001; GILLILAND; SPECK, 1977; GOMES; MALCATA, 1999; HUGHES; HILLIER, 1990). Além disso, raramente estão associados a infecções, sendo considerados organismos seguros (FULLER, 1989).

De acordo com Fuller (1989) o efeito benéfico dos probióticos é mediado por sua ação antagonista direta contra microrganismos específicos, o que faz com que a quantidade destes diminua, seu metabolismo seja prejudicado, ou mesmo, estimule a imunidade de seu hospedeiro.

Os efeitos benéficos dos *Lactobacillus* são provenientes da produção de uma vasta quantidade de metabólitos ativos os quais os assistem na rivalidade com outros microrganismos que ocupem o mesmo nicho ecológico, dentre eles estão: os ácidos orgânicos (ácido láctico, acético, ácidos graxos), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, substâncias antimicrobianas de baixa massa molecular, bacteriocinas e substâncias tipo bacteriocinas (KARAOĞLU et al., 2003). Estes metabólitos, especialmente o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico, fazem com que os *Lactobacillus* desempenhem um papel crucial na produção de alimentos fermentados como vegetais, carnes e produtos lácticos (leites, iogurtes e queijos) (BERNARDEAU et al., 2008; STILES, 1996).

Os *Lactobacillus* são as bactérias mais comuns na fabricação de produtos lácticos e probióticos, mas também se mostram uma ótima fonte alternativa à administração de antibióticos e outros produtos sintéticos utilizados atualmente, sendo empregados na restauração da microbiota intestinal normal (FULLER, 1989), na biopreservação de alimentos como alternativa aos produtos químicos sintetizados na indústria (REIS et al., 2012) e no controle da contaminação de alimentos por esporos fúngicos (GEREZ et al., 2013).

Dentre as espécies pertencentes ao grupo dos *Lactobacillus* destacam-se os *Lactobacillus acidophilus*. Estas bactérias encontram-se presentes nas mucosas oral, gastrointestinal e urogenital humanas, onde aderem ao epitélio e alteram seu ambiente de forma que dificultam a colonização por outras bactérias através da competição por recursos, predação por bacteriofagia e produção de metabólitos inibitórios (BORGES; SILVA; TEIXEIRA, 2014; CHARTERIS et al., 2001; SILVA et al., 1987)

Também denominados Bacilos de Döderlein, os *Lactobacillus acidophilus* foram descritos pela primeira vez pelo professor Albert Döderlein em 1892. Döderlein, em seus estudos pioneiros sobre as bactérias presentes em secreções vaginais, caracterizou tais organismos como Gram-positivos, fermentadores, não formadores de esporos e não flagelados (BORGES et al., 2014; GOMES; MALCATA, 1999; HICKEY et al., 2012). Ele também observou que a atividade bactericida das secreções vaginais estava associada à produção de ácido láctico devido ao processo de fermentação realizada pelos bacilos (LASH; KAPLAN, 1926). Posteriormente, os Bacilos de Döderlein passaram a ser denominados *Lactobacillus acidophilus* até que na década de 80, foi descoberto que os *Lactobacillus acidophilus*, antes descritos como uma espécie, na verdade formam um grupo bastante heterogêneo de bactérias proximamente relacionadas, homofermentativas obrigatórias coletivamente chamadas de Complexo de *Lactobacillus acidophilus* (LAUER; HELMING; KANDLER, 1980). Ensaio utilizando biologia molecular permitiram identificar seis grupamentos genômicos deste complexo: os *L. acidophilus* propriamente ditos, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e (FUJISAWA et al., 1992; POT; TSAKALIDOU, 2009).

Integrantes da microbiota normal do intestino e da vagina, os *Lactobacillus acidophilus* são as bactérias mais abundantes nestes ambientes. (ANDERSON et al., 2009; RAY, 1996). Seu papel na microbiota intestinal humana é auxiliar na

diminuição do nível de fungos e bactérias maléficas e produzir a lactase, uma enzima importante na digestão do leite (DERAZ et al., 2007).

No órgão reprodutor feminino, também possuem grande relevância na manutenção da microbiota normal, pois a maioria das espécies de *Lactobacillus* predominantes neste órgão pertence ao complexo dos *Lactobacillus acidophilus*, os quais se mostram espécies-chave contra infecções vaginais devido à sua habilidade em produzir, principalmente, o ácido láctico por meio da fermentação de carboidratos (HICKEY et al., 2012; HUGHES; HILLIER, 1990). Esta comunidade dominada por bactérias produtoras de ácido láctico compete com outros microrganismos por espaço e recursos.

A presença do ácido láctico, produzido tanto pelos *Lactobacillus acidophilus* quanto pela mucosa vaginal, diminui o pH local mantendo-o entre 4,0 e 4,5, criando um ambiente que limita o crescimento de outras bactérias (HICKEY et al., 2012).

Os *Lactobacillus acidophilus*, bem como todos os *Lactobacillus*, apresentam basicamente duas formas de interferência contra patógenos: aderência ao epitélio formando uma barreira que impede a colonização, levando à competição pelos receptores presentes nas células epiteliais, e a produção de compostos antimicrobianos como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas (BORGES et al., 2014; BORIS; BARBES, 2000; FULLER, 1989).

A síntese e o papel do ácido láctico dos *Lactobacillus acidophilus* pertencentes à microbiota normal humana já são bem estabelecidos na literatura, contudo, nos últimos anos, outras moléculas produzidas por esses procariontes tem ganhado destaque: os peptídeos antimicrobianos.

1.3 Peptídeos antimicrobianos (PAM)

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas naturalmente produzidas por praticamente todas as formas de vida existentes no planeta, desde as mais simples bactérias até os vertebrados, constituindo o mecanismo evolutivo mais antigo, porém complexo em sua funcionalidade, de resistência à invasão por microrganismos, uma vez que, ao longo da evolução, a capacidade de defesa contra espécies invasoras se tornou um fator chave na luta pela sobrevivência (HASSAN et al., 2012; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012; YEAMAN; YOUNT, 2003).

Os peptídeos antimicrobianos formam uma classe heterogênea de compostos que, de forma geral, são definidas como moléculas de pequeno tamanho (variando de 5 a 100 resíduos de aminoácidos), catiônicas, com alta proporção de resíduos hidrofóbicos e solubilidade em água, propriedades que permitem as interações necessárias para ativar seus mecanismos de ação (LI et al., 2012; ZHANG; GALLO, 2016).

O mecanismo de ação típico de um peptídeo antimicrobiano costuma ser a interação eletrostática com a membrana plasmática, formando poros que levam ao extravasamento do conteúdo intracelular e, conseqüentemente, à morte celular (BROGDEN, 2005; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; NICOLAS, 2009). As interações mais comuns que levam à desintegração da membrana plasmática são os modelos do tipo Barril, Carpete e Poro toroidal.

O modelo do tipo “barril” ocorre quando o peptídeo se insere perpendicularmente na bicamada fosfolípídica formando poros revestidos pelo próprio peptídeo que se comportam como canais iônicos, mantendo, a região apolar do peptídeo em contato com a região hidrofóbica dos fosfolípidios da membrana e a região hidrofílica do peptídeo fica voltada para dentro do poro (BAHAR; REN, 2013; RAPAPORT; SHAI, 1992). O modelo do tipo “poro toroidal” se assemelha ao modelo de barril, pois o peptídeo também se insere perpendicularmente na bicamada, com a diferença que o peptídeo mantém contato apenas com a porção hidrofílica do lipídeo, forçando-o a se rearranjar e formando poros. O modelo do tipo “carpete” faz com que o acúmulo de peptídeos na superfície da membrana gere uma tensão na bicamada, levando à ruptura da membrana e formando micelas. Por fim, os peptídeos podem também agir intracelularmente, penetrando na célula e inibindo a síntese, ou proteínas da síntese, de DNA/ RNA, proteínas enoveladoras, enzimáticas, ou mesmo a síntese da parede celular (BAHAR; REN, 2013; MAHLAPUU et al., 2016).

Os mecanismos de ação anteriormente citados estão representados na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática de alguns mecanismos de ação típicos dos PAM.

Em solução aquosa os peptídeos não costumam estar em sua forma conformacional. Ao entrar em contato com os lipídeos da membrana, os PAM assumem sua conformação. Quando atingem uma concentração ideal, eles são capazes de desnaturar a membrana de três maneiras diferentes: modelo barril (esquerda), modelo carpete (centro) ou modelo poro toroidal (direita) ou podem penetrar (translocar) na célula e atuar intracelularmente. Fonte: (MAHLAPUU et al., 2016).

Componentes fundamentais da imunidade dos seres eucariontes, os peptídeos antimicrobianos são considerados a linha de frente na defesa destes organismos, pois agem como mediadores da resposta imune sendo essenciais tanto na prevenção quanto no combate às infecções (BOWDISH; DAVIDSON; HANCOCK, 2005; HANCOCK; LEHRER, 1998). Já nos procariontes, seres de estrutura mais simples e sem sistema imunológico, estes peptídeos conferem uma vantagem ecológica na competição por recursos, especialmente contra organismos que ocupem um nicho semelhante ao seu (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

Quando produzidos por procariontes, os peptídeos antimicrobianos são também denominados bacteriocinas: peptídeos ou proteínas, produzidos pela maioria das bactérias e que apresentam função antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral e/ou antitumoral (HASSAN et al., 2012; KLAENHAMMER, 1988; LI et al., 2012; RILEY, 1998). Bacteriocinas são moléculas de alta potência e especificidade e espectro de inibição limitado a poucas espécies, as quais são normalmente semelhantes à sua, enquanto peptídeos antimicrobianos eucariontes apresentam espectro de inibição mais amplo, mas com baixa potência e

especificidade (HASSAN et al., 2012; JENSSEN et al., 2006; OH; KIM; WOROBO, 2000). Contudo, atualmente é reconhecido que as bacteriocinas também podem apresentar amplo espectro de atuação contra bactérias de outros gêneros (REA et al., 2011).

As bacteriocinas são moléculas muito diversas em termos de tamanho, microrganismos-alvo, modos de ação/liberação e mecanismos imunológicos, sendo divididas em dois grupos: produzidas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (GORDON; O'BRIEN, 2006; HENG et al., 2007). A diversidade é tão grande que dentro de uma mesma espécie dezenas de bacteriocinas diferentes podem ser produzidas (JAMES et al., 2002; RILEY; GORDON, 1992).

Quando originárias de bactérias Gram-negativas, são divididas em duas famílias: moléculas de grande massa molecular (30–80 kDa), denominadas Colicinas e de baixa massa molecular (1-10 kDa), denominadas microcinas. A classificação das bacteriocinas de bactérias Gram-positivas é mais complicada devido à heterogeneidade e por serem mais estudadas que as Gram-negativas, o que faz sua classificação ser modificada com frequência (REA et al., 2011).

Uma das divisões mais comuns na literatura separa as bacteriocinas em dois grupos: lantibióticas termoestáveis (Classe I) e não-lantibióticas termoestáveis (Classe II). Estas duas classes são ainda divididas em subclasses (CHATTERJEE et al., 2005; COTTER et al., 2005; NES; BREDE; HOLO, 2006). Contudo, dependendo do autor essa classificação pode variar.

As bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-lácticas tais como os *Lactobacillus acidophilus*, eliminam suas células-alvo, principalmente, através da formação de poros em sua membrana, ocasionando a eliminação de compostos moleculares que interferem na força próton-motriz, processo prejudicial à célula que pode causar sua morte (HASSAN et al., 2012). Este processo ocorre pela ligação da bacteriocina a um alvo específico, como ocorre entre a Nisina (Classe I) e o lipídio II ou outras bacteriocinas com proteínas do Sistema manose-fosfotransferase (Man-PTS), um sistema de transporte exclusivo de bactérias (BROTZ et al., 1998; DIEP et al., 2007). Outro modo de ação das bacteriocinas é sua interferência em processos metabólicos das células-alvo, como o bloqueio da síntese de compostos da parede bacteriana (HASPER et al., 2006; WIEDEMANN et al., 2001).

Em geral, as bacteriocinas precisam de um receptor na célula-alvo para exercer sua atividade, mas foi descrita uma bacteriocina que age pelo mecanismo

de formação de um poro toroidal, semelhante ao que ocorre em alguns peptídeos antimicrobianos de eucariontes (YONEYAMA et al., 2009).

Sintetizados pelos ribossomos a partir do DNA codificante, esses compostos foram um dos primeiros peptídeos antimicrobianos a serem isolados e caracterizados e, desde então, mais de 250 bacteriocinas já são conhecidas (LI et al., 2012; MATTICK; HIRSCH, 1947; ZHANG; GALLO, 2016). A Nisina uma das bacteriocinas mais famosas, sintetizada pelas bactérias do leite *Lactococcus lactis*, foi descoberta em 1.947 e é comercializada desde 1.953, sendo o único peptídeo antimicrobiano natural aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como conservante alimentício (CLEVELAND et al., 2001).

A crescente preocupação com o uso abusivo dos antibióticos e o surgimento das bactérias multirresistentes reacendeu o interesse pelos peptídeos antimicrobianos, ofuscados pela era dos antibióticos que se iniciou em 1928 com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (HASSAN et al., 2012). Os antibióticos foram uma grande descoberta do século XX, mas vem perdendo a sua eficácia cada vez mais devido à evolução dos mecanismos de resistência microbiana (STECKBECK; DESLOUCHES; MONTELARO, 2014). Este tema é tão preocupante, que fez a ONU incluí-lo na lista de maiores ameaças à saúde em 2019.

Por suas propriedades bioquímicas, amplo espectro de atividade inibitória e seus meios de ação, os peptídeos antimicrobianos são considerados antibióticos naturais e tem despertado um crescente interesse dos pesquisadores e da indústria (DA COSTA et al., 2015). Sobretudo, como agentes terapêuticos em substituição aos antibióticos convencionais, pois além de modular a resposta imune, atuam contra os microrganismos sem prejudicar as células do hospedeiro (JENSSEN et al., 2006; LI et al., 2012; PASUPULETI et al., 2012). Além disso, os peptídeos possuem a vantagem de apresentarem baixa toxicidade, pois agem apenas contra as moléculas-alvo e são degradados em resíduos de aminoácidos (DA COSTA et al., 2015). Tendo em vista a busca por novas fontes de tratamento para os microrganismos multirresistentes e por produtos com menos aditivos químicos, as moléculas bioativas bacterianas constituem uma excelente alternativa, seja como probióticos utilizados na terapêutica para restauração da microbiota normal, no tratamento de infecções dos tratos gastrointestinal e urogenital humanos como na biopreservação de alimentos.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho obteve peptídeos antimicrobianos extraídos de *Lactobacillus acidophilus* com amplo espectro de ação (contra bactérias Gram-positivas, negativas e leveduras), além de ser um dos poucos que demonstra ação de uma bacteriocina contra leveduras, especialmente a *Candida albicans*, o que torna estas amostras muito interessantes do ponto de vista biotecnológico, pois se mostram potenciais aliadas na luta contra os microrganismos multirresistentes a diversos antibióticos atuais.

Estudos mais detalhados sobre as moléculas obtidas, tanto nativas quanto sintéticas, são necessários para ampliar o conhecimento sobre suas propriedades e possíveis aplicações.

REFERÊNCIAS*

ANDERSON, R. A. et al. Differential Sensitivity of Lactobacillus spp. to Inhibition by Candidate Topical Microbicides. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 1, n. 1, p. 24-35, Jun 2009.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. **Food science and technology**, v. 139, p. 1-66, 2004.

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 1543-75, Nov 28 2013.

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus. **Int J Food Microbiol**, v. 126, n. 3, p. 278-85, Sep 1 2008.

BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. **Arch Gynecol Obstet**, v. 289, n. 3, p. 479-89, Mar 2014.

BORIS, S.; BARBES, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes Infect**, v. 2, n. 5, p. 543-6, Apr 2000.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J.; HANCOCK, R. E. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. **Curr Protein Pept Sci**, v. 6, n. 1, p. 35-51, Feb 2005.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 238-50, Mar 2005.

BROTZ, H. et al. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 317-27, Oct 1998.

CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. **Encyclopedia of food sciences and nutrition / Vol. 8, [Pre-Soy]**. 2nd ed. Amsterdam [etc.]: Academic press, 2003. ISBN 0122270630 9780122270635.

CHARTERIS, W. P. et al. Antibacterial activity associated with Lactobacillus gasseri ATCC 9857 from the human female genitourinary tract. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 615-625, 08/01 2001.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2011.

CHATTERJEE, C. et al. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. **Chem Rev**, v. 105, n. 2, p. 633-84, Feb 2005

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int J Food Microbiol**, v. 71, n. 1, p. 1-20, Dec 4 2001.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 10, p. 777-88, Oct 2005.

DA COSTA, J. P. et al. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 5, p. 2023-40, Mar 2015.

DERAZ, S. F. et al. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, n. 5, p. 373-9, May 2007.

DIEP, D. B. et al. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 7, p. 2384-9, Feb 13 2007.

FUJISAWA, T. et al. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). **Int J Syst Bacteriol**, v. 42, n. 3, p. 487-91, Jul 1992.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J Appl Bacteriol**, v. 66, n. 5, p. 365-78, May 1989.

GEREZ, C. L. et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. **Biological Control**, v. 64, n. 3, p. 231-237, 2013/03/01/ 2013.

GILLILAND, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 7, n. 1-2, p. 175-88, Sep 1990.

GILLILAND, S. E.; SPECK, M. L. Antagonistic Action of *Lactobacillus acidophilus* Toward Intestinal and Foodborne Pathogens in Associative Cultures (1). **J Food Prot**, v. 40, n. 12, p. 820-823, Dec 1977.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Res Microbiol**, v. 161, n. 6, p. 480-7, Jul-Aug 2010.

GOLDSTEIN, E. J.; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. Lactobacillus species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clin Infect Dis**, v. 60 Suppl 2, p. S98-107, May 15 2015.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4, p. 139-157, 1999/04/01/ 1999.

GORDON, D. M.; O'BRIEN, C. L. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in Escherichia coli. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 11, p. 3239-44, Nov 2006.

HAMMES, W.; HERTEL, C. The Genera Lactobacillus and Carnobacterium. In: (Ed.), v.4, 2006. p.320-403.

HANCOCK, R. E.; LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 2, p. 82-8, Feb 1998.

HASPER, H. E. et al. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. **Science**, v. 313, n. 5793, p. 1636-7, Sep 15 2006.

HASSAN, M. et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **J Appl Microbiol**, v. 113, n. 4, p. 723-36, Oct 2012.

HENG, N. C. et al. Ubericin A, a class IIa bacteriocin produced by Streptococcus uberis. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 23, p. 7763-6, Dec 2007.

HICKEY, R. J. et al. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. **Transl Res**, v. 160, n. 4, p. 267-82, Oct 2012.

HUGHES, V. L.; HILLIER, S. L. Microbiologic characteristics of Lactobacillus products used for colonization of the vagina. **Obstet Gynecol**, v. 75, n. 2, p. 244-8, Feb 1990.

JAMES, R. et al. Killing of E coli cells by E group nuclease colicins. **Biochimie**, v. 84, n. 5-6, p. 381-9, May-Jun 2002.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 491-511, Jul 2006.

KARAOĞLU, Ş. A. et al. Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal Lactobacilli. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 33, p. 7-13, 01/01 2003.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, n. 3, p. 337-49, Mar 1988.

LASH, A. F.; KAPLAN, B. A Study of Döderlein's Vaginal Bacillus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 333-340, 1926.

LAUER, E.; HELMING, C.; KANDLER, O. Heterogeneity of the Species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as Revealed by Biochemical Characteristics and DNA-DNA hybridisation. **Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie**, v. 1, n. 2, p. 150-168, 1980/04/01/ 1980.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-15, Oct 2012.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. 194, 2016-December-27 2016.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 1199-1208, 2007.

MASOOD, M. I. et al. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Crit Rev Microbiol**, v. 37, n. 1, p. 91-8, Feb 2011.

MATTICK, A. T.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **Lancet**, v. 2, n. 6462, p. 5-8, Jul 5 1947.

NES, I. F.; BREDE, D. A.; HOLO, H. CHAPTER 17 - The Nonantibiotic Heat-Stable Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: KASTIN, A. J. (Ed.). **Handbook of Biologically Active Peptides**. Burlington: Academic Press, 2006. p.107-114. ISBN 978-0-12-369442-3.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends Biotechnol**, v. 29, n. 9, p. 464-72, Sep 2011.

NICOLAS, P. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. **Febs j**, v. 276, n. 22, p. 6483-96, Nov 2009.

OH, S.; KIM, S. H.; WOROBO, R. W. Characterization and Purification of a Bacteriocin Produced by a Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2747-2752, 2000/12/01/ 2000.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Crit Rev Biotechnol**, v. 32, n. 2, p. 143-71, Jun 2012.

POT, B.; TSAKALIDOU, E. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. In: (Ed.), 2009. p.3-58.

PRIEST, F.; GOODFELLOW, M. **Applied Microbial Systematics**. 2000. ISBN 978-0-7923-6518-1.

RAPAPORT, D.; SHAI, Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogs with lipid bilayers. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, p. 23769-75, 01/01 1992.

RAY, B. Probiotics of Lactic Acid Bacteria: Science or Myth? **NATO ASI SERIES H CELL BIOLOGY**, n. 98, p. 101-136, 1996.

REA, M. et al. Classification of bacteriocins from gram positive bacteria in prokaryotic antimicrobial peptides. **Eds Drider/Rebuffat Springer**, p. 29-54, 01/01 2011.

REIS, J. A. et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, 06/01 2012.

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annu Rev Genet**, v. 32, p. 255-78, 1998.

RILEY, M. A.; GORDON, D. M. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. **J Gen Microbiol**, v. 138, n. 7, p. 1345-52, Jul 1992.

SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 4, n. 4, p. 217-26, Dec 2012.

SCHLEIFER, K.; LUDWIG, W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, p. 7-18, 01/01 1995.

SILVA, M. et al. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 31, n. 8, p. 1231-1233, 1987.

SOZZI, T. et al. Bacteriophages of the genus Lactobacillus. **Intervirology**, v. 16, n. 3, p. 129-35, 1981.

STECKBECK, J. D.; DESLOUCHES, B.; MONTELARO, R. C. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? **Expert Opin Biol Ther**, v. 14, n. 1, p. 11-4, Jan 2014.

STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 70, n. 2-4, p. 331-45, Oct 1996.

TRIAS, R. et al. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. **Int Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 231-6, Dec 2008.

VUYST, L. D.; VANDAMME, E. J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria : microbiology, genetics, and applications**. 1st ed. London ; : Blackie Academic & Professional, 1994. ISBN 185861032X 9781858610320 0751401749 9780751401745.

WIEDEMANN, I. et al. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. **J Biol Chem**, v. 276, n. 3, p. 1772-9, Jan 19 2001.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. ISBN 075140215X 9780751402155.

WOOD, B. J. B.; WARNER, P. J. **Genetics of Lactic Acid Bacteria**. 2003. ISBN 978-1-4613-4959-4.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 1, p. 27-55, Mar 2003.

YONEYAMA, F. et al. Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticin Q. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3211-7, Aug 2009.

YOTHER, J. et al. Genetics of Streptococci, Lactococci, and Enterococci: Review of the Sixth International Conference. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 22, p. 6085-6092, 2002.

ZHANG, L. J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Curr Biol**, v. 26, n. 1, p. R14-9, Jan 11 2016.

ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M. A microbial world within us. **Mol Microbiol**, v. 59, n. 6, p. 1639-50, Mar 2006.