

NISINA: UM CONSERVANTE NATURAL PARA ALIMENTOS¹

Nathália Ramos de Melo²

Nilda de Fátima Ferreira Soares³

Maria Paula Junqueira C. Gonçalves⁴

RESUMO

O crescente interesse por alimentos processados e que ainda mantenham as suas características mais próximas do natural tem incentivado pesquisadores a buscar associações de tecnologias para conservar os alimentos com qualidade e segurança alimentar. Algumas bactérias ácido lácticas, como *Lactococcus lactis* NIOZR5, 6F3, NCFB894, ATCC11454, N8, NIZO22186, produzem as bacteriocinas ou peptídeos antibacterianos, que retardam ou inibem o crescimento de outras bactérias. A bacteriocina nisina, que é naturalmente produzida em vários alimentos fermentados, vem sendo consumida por humanos há séculos. A nisina tem seu uso aprovado em alimentos em mais de 50 países, e, em 1988, o FDA concedeu-lhe o status de GRAS ("Generally Recognized As Safe"). Esta revisão mostra avanços nos estudos da bioquímica, genética, resistência e modo de ação, além da aplicabilidade desse peptídeo em alimentos. Estudos têm mostrado a baixa toxicidade da nisina e sua alta eficiência como conservante em alimentos. O uso da nisina em alimentos pode ser na forma de imersão do produto em uma solução que a contém ou ela pode ser incorporada nas embalagens ativas que, ao serem usadas no acondicionamento do produto será liberada de forma controlada para a sua superfície.

Palavras chave: bacteriocina, nisina, conservante natural, preservação de alimento.

¹ Aceito para publicação em 28.03.2005.

² Dep. de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: nethaliarm@hotmail.com

³ Dep. de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: nfsoares@ufv.br

⁴ Dep. de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: mariapaula@vicosa.ufv.br

ABSTRACT

NISIN: A NATURAL FOOD ADDITIVE

The increasing interest processed foods that maintain its fresh characteristic has encouraged in producer to look for new technologies to preserve food with quality and microbiological safety. Some lactic acid bacteria, such as *Lactococcus lactis* NIOZR5, 6F3, NCFB894, ATCC11454, N8, NIZO22186 produce bacteriocins or antibacterial peptides that kill or inhibit the growth of other bacteria. The peptide nisin is produced naturally in several fermented foods, and has been consumed by humans for centuries. It is approved for foodstuff use in more than 50 countries. In 1988, the FDA considered nisin with status of GRAS ("Generally Recognized as Safe"). This review outlines some advances in the studies of the biochemistry, genetics, resistance and mechanism of action besides the applicability of peptide as an additive in food. Research has show the low toxicity of nisina and its high efficiency as a food preservative. Nisin can be sprayed on the product surface or incorporated into the active packaging that will release it to the food surface .

Key words: bacteriocin, nisin, natural additive, food preservation.

INTRODUÇÃO

Preservação dos Alimentos

A maior parte dos alimentos de origem vegetal ou animal se deteriora com facilidade, perdendo a qualidade com conseqüente diminuição na vida de prateleira. Essa perda é dependente de vários fatores, dentre eles o tipo, a composição, formulação, embalagem e condição de estocagem do alimento.

A principal forma de deterioração dos alimentos é de origem microbiológica, principalmente por contaminantes contidos na superfície dos alimentos. A presença de microrganismos nos alimentos pode, além de reduzir a vida de prateleira, causar intoxicações ou infecções (dependendo do microrganismo contaminante) no consumidor (38).

Carmo (10) relatou, em seus estudos, 112 surtos de intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica no estado de Minas Gerais, Brasil, de 1995 a março de 2001 (Quadro 1).

Recentes estimativas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) calculam que ocorrem 76 milhões de casos de doenças alimentares por ano, com aproximadamente 5000 mortes nos Estados Unidos. Muitas destas doenças estão associadas a *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Toxoplasma gondii* (13).

QUADRO 1 - Surtos de intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica ocorridos no Estado de Minas Gerais, de 1995 a março de 2001

Alimentos envolvidos	Surtos	Pessoas acometidas	Óbitos
Queijos (diversos)	23	660	01
Bolo recheado	20	750	00
Refeição pronta	52	9.500	16*
Frango e embutidos	05	600	0
Leite e derivados	06	380	0
Massas	03	130	0
Maionese caseira	03	800	0
Total	112	12.820	17

*Ocorridos em um surto durante uma festa de confraternização.
Fonte: Carmo (10).

Para manter a vida de prateleira desejada dos alimentos, utiliza-se de aditivos que mantêm a seguridade destes para o consumidor (47). Porém, nas últimas décadas, tem sido crescente a procura por alimentos minimamente processados, que mantenham suas características mais próximas do natural. O crescente interesse dos consumidores por este tipo de alimento tem incentivado pesquisadores a buscar tecnologias de processamento que atendam a essa demanda (13; 30; 46), uma vez que o consumidor tem preferido os alimentos com baixo nível de aditivos (18).

Para a conservação dos alimentos, devem-se evitar os diferentes tipos de deterioração, principalmente impedir o crescimento microbiano. Métodos tradicionais de conservação de alimentos que têm efeito no crescimento microbiano incluem tratamentos térmicos, desidratação, congelamento, refrigeração, irradiação, embalagem com atmosfera modificada e adição de agentes antimicrobianos ou sal (18; 39).

Além das tecnologias tradicionais, outras têm sido desenvolvidas, como os tratamentos sob alta pressão hidrostática, pulsos elétricos, utilização de embalagens ativas, aditivos antimicrobianos naturais e biopreservativos (18).

Vários aditivos naturais têm sido estudados para serem utilizados como agentes antimicrobianos. Estes componentes provêm de animais, plantas e microrganismos que são freqüentemente utilizados como agentes de defesa nos organismos que os sintetizam, como lacperoxidases (leite), lisozima (ovo branco, figo), saponinas e flavonóides (ervas), bacteriocinas (bactérias do ácido láctico) e quitosana (camarão) (18).

Existem bactérias que produzem substâncias antagônicas a outros organismos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e

bacteriocinas ou peptídeos antibacterianos (46). Em alimentos como carne, leite e derivados, em que as bactérias lácticas (LAB) são contaminantes naturais, ocorre a produção de bacteriocinas, que atuam como conservantes nesses produtos (13).

Com o desenvolvimento crescente da área de produtos alimentícios industrializados, a segurança alimentar é um parâmetro de qualidade fundamental para as indústrias. Assim, a aplicação de peptídeos antimicrobianos provenientes de LAB, que são ativos contra patógenos, sem causar toxicidade ou outro efeito adverso, tem recebido mais atenção (13).

Barreiras tecnológicas combinam métodos diferentes de preservação para inibir o crescimento microbiano. Estudos mostram que as bacteriocinas têm efeito sinergista quando usadas em combinação com outros tratamentos, como barreiras para promover a segurança dos alimentos (13; 19).

BACTERIOCINAS

De acordo com a definição de Moreno et al. (34), as bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas, ou complexos protéicos que têm ação bactericida exclusivamente em bactérias gram-positivas e espécies relacionadas. Cleveland et al. (13) afirmam que as bacteriocinas são proteínas antibacterianas produzidas por bactérias que matam ou inibem o crescimento de outras bactérias. Segundo McAuliffe et al. (31), as bacteriocinas são compostos protéicos que matam bactérias relacionadas.

As bacteriocinas são divididas em três grandes classes, segundo Klaenhammer, citado por McAuliffe et al. (31) e Cleveland et al. (13):

Classe I (Lantibióticos) – são os peptídeos que contêm de 19 a 50 aminoácidos (aa) e geralmente apresentam lantionina, metil-lantionina, deidrobutirina e deidroalanina em sua estrutura. Sofrem modificação após a síntese para adquirir sua forma ativa. Essa classe é subdividida em Ia e Ib. A subclasse Ia é composta dos peptídeos catiônicos e hidrofóbicos que têm como mecanismo de ação a formação de poros na membrana e têm sua estrutura mais flexível quando comparada com a dos peptídeos da classe Ib. A nisina está incluída nesta classe. A subclasse Ib é composta por peptídeos globulares com carga neutra ou negativa, como a mersacidina.

Classe II – apresenta peptídeos de pouca estabilidade térmica e nenhuma modificação. Também pode ser subdividida em IIa e IIb. A subclasse IIa apresenta bacteriocinas ativas contra *Listeria*, tem uma seção de consenso Tyr-Gly-Asn-Gly-Val e duas cisteínas, formando ponte de bissulfeto do N-terminal no interior do peptídeo, com a pediocina. Na subclasse IIb (como a lactacina F), encontram-se as bacteriocinas compostas de dois peptídeos diferentes, que só apresentam atividade na presença de um do outro.

Classe III – esta classe é a menos conhecida. Compreende as bacteriocinas de maior cadeia molecular e as mais sensíveis ao calor, como as lactacinas A e B.

Uma quarta classe tem sido proposta, abrangendoiocinas que têm sua forma complexada com outras moléculas.

As classes I e II têm sido mais estudadas para o uso em alimentos.

Como as bacteriocinas agem de forma diferenciada em espécies diferentes de microrganismos, várias pesquisas têm examinado a afinidade delas com diferentes espécies. A composição fosfolipídica da célula e seu pH influenciam o valor da concentração mínima inibitória da bacteriocina (11, 12).

Os peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) apresentam resistência térmica e são sintetizados ribossomicamente. As bacteriocinas, principalmente as provenientes das LAB, têm-se mostrado seguras para o uso como conservante de alimentos (13).

Muitos confundem os termos bacteriocina e antibiótico, o que é um ponto negativo para o uso em alimentos. As bacteriocinas, que claramente se distinguem dos antibióticos (Quadro 2), são efetivas no controle do crescimento de patógenos em alimentos, enquanto os antibióticos não apresentam estas características. Reconhecendo esta diferença, Hurst (25) designou as bacteriocinas como preservativo alimentar biológico.

Porém, há preocupação de que o contato com as bacteriocinas, apesar de não serem antibióticos, possa conferir aos organismos maior resistência aos antibióticos. Cleveland et al. (13) relataram experimentos que se basearam na exposição de microrganismos resistentes a algum antibiótico. Em contato com uma bacteriocina, não foi observada alteração na frequência da resistência ao antibiótico. Também, foram avaliados microrganismos citados como resistentes à bacteriocina testada, e o resultado alcançado foi o mesmo, não havendo cruzamento de resistências. Concluiu-se que a resistência deve ser devida à diferença na forma de ação.

A resistência a antibióticos é geralmente associada com a determinação genética, facilitando assim a transferência da resistência entre células, estirpes e espécies, ao passo que a resistência à bacteriocina resulta de alteração fisiológica na membrana celular. Há experimentos que mostram que alguns mutantes produziram a enzima nisinase, que degrada a nisina e adquire resistência a esta bacteriocina (13). Sendo assim, ainda há controvérsias de idéias sobre a resistência, se é codificada geneticamente ou é resultado de adaptação.

QUADRO 2 - Comparação de características de antibióticos e de bacteriocinas		
Característica	Bacteriocina	Antibiótico
Aplicação	Alimentos	Clínico
Síntese	Ribossomal	Metabolismo secundário
Atividade	Pequeno espectro	Amplio espectro
Imunidade celular da célula produtora	Sim	Não
Mecanismo de resistência ou tolerância celular	Geralmente é adaptação, afetando a composição da membrana celular	Geralmente é determinado por transferência genética, afetando diferentes sítios, dependendo do modo de ação.
Interações requeridas	Ligações moleculares	Interações específicas
Modo de ação	Principalmente formando poros, mas em alguns casos atuam na biossíntese da parede celular	Ataca a membrana celular ou pontos intracelulares específicos
Toxicidade	Nenhuma conhecida	Sim

Fonte: Cleveland et al. (13).

A localização dos genes responsáveis pela atuação das bacteriocinas foi descrita por Cleveland et al. (13) e McAuliffe et al. (31). Eles relatam que os genes que codificam a síntese de bacteriocina podem ser encontrados nos cromossomos, em plasmídeos ou nos transposons. Os organismos sintetizantes de bacteriocinas possuem genes que codificam peptídeos estruturais, bem como proteínas que ajudam no processo de ativação da bacteriocina e no transporte através da membrana. Além disso,

há genes que regulam a síntese das proteínas que conferem imunidade à célula hospedeira produtora.

Os genes que codificam a “proteína de imunidade” e a bacteriocina geralmente estão alocados no mesmo operon e próximos uns dos outros. A exemplo de proteínas imunológicas, tem-se o código de NisI, para nisina, e SpaI para a subtilina. Ainda não está claramente entendido como as proteínas imunológicas agem protegendo o organismo da sua bacteriocina sintetizada.

Os genes que codificam as modificações necessárias à ativação de algumas bacteriocinas, que são sintetizadas em forma inativa, também se encontram próximas ao gene estrutural. Nos lantibióticos, estas modificações ocorrem na formação de vários aminoácidos incomuns. Da mesma forma, nos não-lantibióticos também ocorre modificação pela quebra da seqüência líder, que é necessária para permitir sua secreção e o seu transporte através da membrana.

Não se sabe qual é o real papel da bacteriocina para a cepa que a produz, se é meramente um mecanismo de defesa e competição, ou se possui algum papel regulador do ciclo de vida da célula. Toledo (46) relatou que a nisina adicionada ao meio de cultura, antes do início da sua síntese, inibe e lisa o organismo produtor. Porém, se adicionada ao meio antes de ser inoculado, o crescimento é ligeiramente atrasado, mas o organismo cresce na mesma taxa do controle e atinge a mesma massa.

As bacteriocinas atuam inibindo a síntese da parede celular, causando alteração na permeabilidade da membrana celular, ou inibindo a atividade da RNase ou DNase. Particularmente, os lantibióticos da classe Ia agem em células específicas, formando poros na membrana e, portanto, alterando a sua energia potencial e, ou o gradiente de pH. Essas modificações na membrana resultam no extravasamento do material celular levando a célula à morte (31).

Segundo Cleveland et al. (13), estudos também têm mostrado que as condições físico-químicas do alimento influenciam significativamente na atividade da bacteriocina utilizada. A nisina não foi efetiva em carnes com pH alto e foi inativada pela glutatona, em reação catalizada pela glutatona S-transferase, encontrada em carne bovina. Além disso, observou-se que a gordura reduziu a atividade da nisina.

Os eucariotos também sintetizam alguns peptídeos que fazem parte do seu sistema de defesa, porém são tóxicos ao consumo humano (23).

Estudos para avaliação da atividade das bacteriocinas e sua quantificação têm sido realizados, utilizando-se o método de formação de halo de inibição. Segundo Toledo (46), esse método é resultado da difusão da bacteriocina e da velocidade de crescimento do microrganismo indicador. Uma série de variáveis influencia tal resultado, como: estado

fisiológico da cultura indicadora, concentração do inóculo, umidade do ágar, tempo de difusão da bacteriocina anterior ao início do crescimento da cultura indicadora e o próprio meio de cultura, que afeta tanto a velocidade de crescimento do indicador quanto à de difusão da bacteriocina.

As LAB são usadas como cultura “starter” em alimentos fermentados, por isso as pesquisas têm explorado o uso dessas culturas para a produção de bacteriocinas.

Nunez et al. (37) relataram que estudos utilizando queijo manchego inoculado com uma estirpe de *Enterococcus faecalis*, produtora de bacteriocina, reduziu a contagem de *L. monocytogenes* Ohio em seis ciclos logarítmicos após sete dias.

Algumas culturas “starter” utilizadas na fabricação de produtos não têm o código genético que codifica a síntese de bacteriocina. Assim, estudos têm sido feitos com o objetivo de mutar algumas estirpes para conferir a elas esta característica. Buyong et al. (9) relataram que, como o *Pediococcus* spp. não tem aplicação como cultura “starter” de queijo, o seu plasmídeo que codifica para a pediocina foi expresso em *Lactococcus lactis* e adicionado para a preservação de queijo cheddar para assegurar a qualidade microbiológica do processo de fermentação. O gene para a síntese da pediocina também foi inserido em *Saccharomyces cerevisiae* para preservação de vinho, produtos de padaria e outros produtos que utilizam esta levedura (43).

O uso da bacteriocina não é considerado natural quando aplicado em concentrações acima daquela encontrada no alimento naturalmente fermentado pela cultura natural, ou quando a bacteriocina é produzida por bactérias geneticamente modificadas (13).

Nisina

A nisina é um peptídeo produzido por bactérias comuns do leite e foi, pela primeira vez, identificada em 1928. Das 40 espécies conhecidas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 35 sintetizam essa bacteriocina (13). A capacidade de produzir nisina está geneticamente vinculada à capacidade de fermentar sacarose e é uma característica variável entre os lactococci (46); faz parte do grupo de peptídeos produzidos ribossomicamente; pertence à classe dos lantibióticos e à subclasse Ia (6); e é identificada pelo número de identificação internacional INS como E234 (1).

Segundo McAuliffe et al. (31), a nisina tem atividade em várias espécies incluindo *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* e *Micobacterium*, assim como em células vegetativas e esporos de *Bacillus* e *Clostridium*.

A nisina é naturalmente produzida em vários alimentos fermentados, especialmente produtos lácteos, e vem sendo consumida por humanos há

séculos. É isolada de LAB e já tem seu uso aprovado em alimentos em mais de 50 países [6]. Em 1988, o FDA concedeu-lhe o “status” de GRAS (“Generally Recognized As Safe”). A nisina, após testes toxicológicos e estudos de resistência cruzadas, foi considerada segura como aditivo, sendo digerida em nosso sistema digestivo pela enzima α -quimotripsina (13).

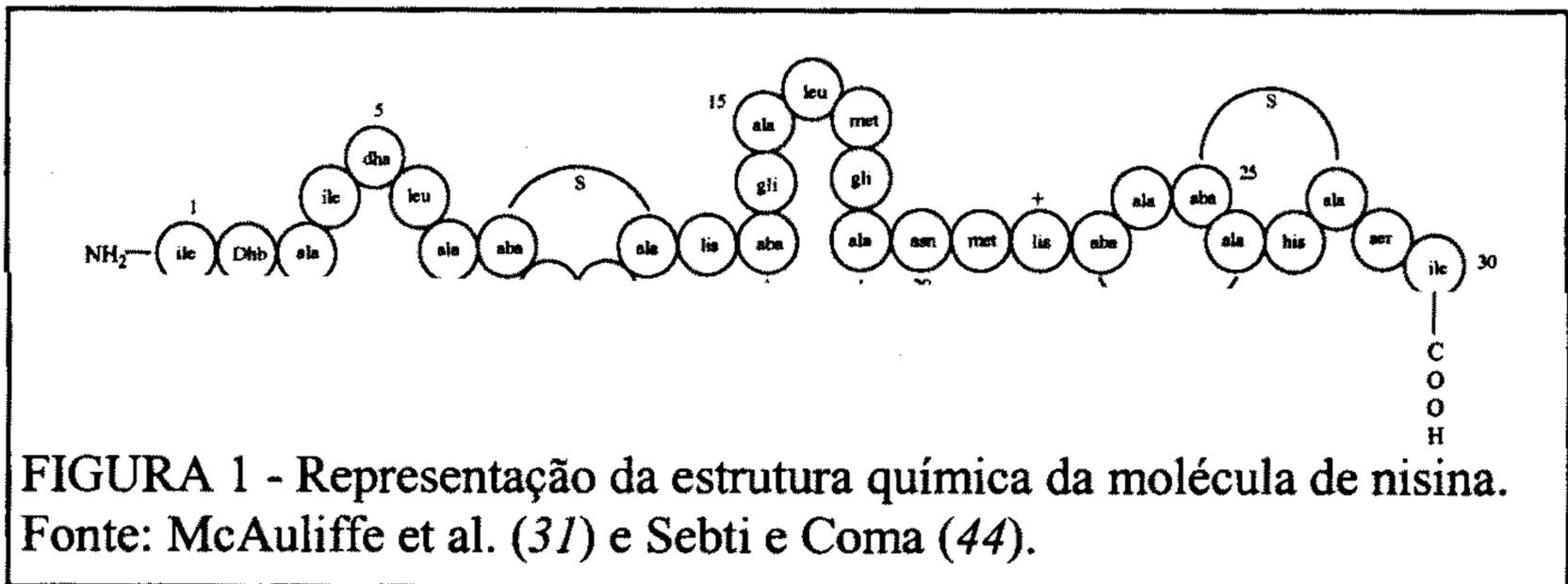
Estudos de toxicidade em ratos revelaram que o valor de LD₅₀ é comparável ao de sais comuns, ou seja, cerca de 7 g.kg⁻¹ de peso corpóreo (46). Há controvérsias quanto à ingestão diária aceitável (IDA). Cleveland et al. (13) citaram 2,9 mg/pessoa/dia, enquanto Moreno et al. (35) citaram um valor 20 vezes maior.

No Brasil, o uso da nisina é permitido em queijos (1), requeijão (2), queijo fundido, queijos pasteurizados (3) e queijo em pó (4), na concentração de 12,5 mg.kg⁻¹ de produto final. A indústria de laticínios no Brasil consome aproximadamente 800 kg de nisina por ano e paga cerca de US\$900/kg (46).

Segundo Toledo (46), a molécula da nisina é um peptídeo de 34 aminoácidos, tendo como aminoácidos terminais a isoleucina e a lisina, com o NH₂ e COOH, respectivamente. Seu peso molecular é de 3,5 kDa. A nisina é formada por oito alaninas (Ala), quatro ácidos aminobutírico (Aba), três glicinas (Gly), três isoleucinas (Ile), três lisinas (Lys), duas leucinas (Leu), duas histidinas (His), duas metioninas (Met), uma serina (Ser), uma valina (Val), uma prolina (Pro), uma asparagina (Asn) e os aminoácidos incomuns, duas deidroalanina (Dha) e uma deidrobutirina (Dhb).

Durante a tradução, a molécula de nisina, na sua forma ainda inativa, contém 57 aminoácidos, todos comuns, sendo 23 resíduos na região-líder e os 34 resíduos na região estrutural. Então, por meio de modificações enzimáticas, a região líder é removida, e a serina e a treonina da região estrutural sofrem desidratação, resultando na formação de Dha e Dhb, respectivamente (13; 46). Subseqüentemente, pontes tioéter são formadas pela condensação da Dha e Dhb com cisteína, produzindo os aminoácidos lantionina (Ala-S-Ala) e β -metil-lantionina (Aba-S-Ala), respectivamente. Nesta forma, tem-se a nisina na sua forma ativa (Figura 1) (46).

Segundo Ray (40), a nisina pode formar dímeros ou polímeros de 7.000 a 14.000 Da pelos seus aminoácidos reativos Dha e Dhb, o que, provavelmente, tenha sido a causa de controvérsias quanto ao seu peso molecular. Trabalhos anteriores indicaram variações na molécula de nisina (25). Esta hipótese baseou-se no fato de que preparações de nisina podem ser desdobradas em cinco polipeptídios diferentes (nissinas de A a E), avaliados por meio de cromatografia (25).



As cinco moléculas de nisina (A, B, C, D, E) diferenciam-se por pequenas alterações em sua composição de aminoácidos, dependendo do tempo e das condições de armazenamento. As nisinas C e D apresentam somente 1/5 da atividade biológica das nisinas A e B, a nisina D é a mais resistente à nisinase de *Bacillus cereus*, e as nisinas B e E parecem ser produtos de degradação da nisina A (25). Há uma variante natural da nisina, a nisina Z, cuja molécula é idêntica à nisina A, exceto pela substituição da histidina pela asparagina na posição 27 da molécula ativa. Essas duas nisinas parecem possuir as mesmas atividades biológicas, porém a nisina Z apresenta propriedades de difusão diferentes (35).

Segundo Moreno et al. (35), a solubilidade, a estabilidade e a atividade biológica da nisina são altamente dependentes do pH, da temperatura e da natureza do substrato. As bacteriocinas também são altamente sensíveis às enzimas proteolíticas (21, 34). No entanto, a nisina apresenta estabilidade a tratamentos térmicos, tratamentos de alta pressão e exposição a ambientes ácidos (6).

A solubilidade é influenciada pelo aumento da concentração de fosfato e pela presença de proteína (7).

Segundo Guiotto et al. (21) a nisina é pouco solúvel em meio aquoso neutro a moderadamente alcalino.

A alta proporção de aminoácidos básicos confere-lhe uma carga líquida positiva e seu ponto isoelétrico é 10,5. Os aminoácidos insaturados Dha e Dhb são susceptíveis ao ataque de nucleófilos (grupos hidroxil ou R nucleofílicos) presentes em pH alto. Tal fato talvez explique a instabilidade e a solubilidade diminuídas em condições básicas. A nisina é insolúvel em solventes apolares (29).

Sua solubilidade em meio aquoso é altamente dependente do pH. À medida que o pH aumenta a solubilidade diminui, passando de 57 mg.mL⁻¹

em pH 2 para $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ em pH 8 (29). Hurst (25) afirma que em pH 2,5 a solubilidade da nisina é de 12%, decrescendo para 4% em pH 5,0 e praticamente insolúvel em pH neutro ou alcalino.

Uma propriedade notável da nisina é sua estabilidade no calor, suportando autoclavagem ($121^\circ\text{C}/15 \text{ min}$) em pH 2,5, sem sofrer perda de atividade. Em pH 5, porém, ela perde 40% de atividade, e em pH acima de 6,8 a perda é de 90% (15). Sua estabilidade ao calor em baixo pH é atribuída, em parte, às suas cinco pontes de enxofre, que lhe conferem uma estrutura tridimensional rígida, apesar de não apresentar uma estrutura secundária.

Segundo Moreno et al. (34), a maioria das bacteriocinas tem melhor estabilidade de sua atividade em pH de ácido a neutro, sendo praticamente inativadas em pH 8,0, a exemplo da nisina. Liu e Hansen (29) dizem que a inativação da nisina em meio alcalino pode ser consequência de desnaturação, modificação química ou uma combinação de ambos. Os resíduos de deidro são altamente susceptíveis a modificações por nucleofílicos em pH elevado, assim como íons de hidroxila, aminas desprotonadas e grupamentos hidroxil desprotonados.

Estudos relacionados ao mecanismo de ação da nisina apontaram a membrana citoplasmática como o alvo primário (8). Também, como efeitos da nisina em células susceptíveis a sua ação, inclui-se a inibição da biossíntese de RNA, DNA, de proteína, enzimas, polissacarídeos e outros pontos que levam a morte da célula (13).

A nisina aumenta a permeabilidade da membrana pela formação de poros, ocasionando o efluxo do material intracelular. Assim, relata-se que, após o tratamento com nisina, as células ficam sem energia suficiente para realizar processos biossintéticos e que a membrana plasmática, transdutora de energia, pode ser o alvo primário na atuação da nisina (26).

Sendo a bacteriocina carregada positivamente com partes hidrofóbicas, ocorrem interações eletrostáticas com o grupamento fosfato da membrana celular, carregado negativamente, promovendo o início da ligação da bacteriocina com a célula-alvo (11, 12).

Cleveland et al. (13) e Bower et al. (6) mostraram a habilidade da nisina em inibir o crescimento microbiano de bactérias gram-positivas, inclusive as patogênicas de alto risco em alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecalis*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*.

Segundo Moreno et al. [33], a ação da nisina sobre células de bactérias gram-positivas ocorre em duas etapas. A primeira envolve a adsorção não-específica da nisina sobre a parede celular, sendo o fenômeno reversível. Essa adsorção é dependente do pH, que ocorre em valor mínimo de 3,0 e máximo de 6,5, da composição fosfolipídica da membrana citoplasmática dos microrganismos sensíveis, da presença de cátions

divalentes e trivalentes (Mg^{+2} , Ca^{+2} e Gd^{+3}), e da concentração utilizada. Estudos mostraram que, considerando 100% de adsorção em pH 6,5, ocorreu adsorção de 69% em pH 5,5 e 43% em pH 4. A nisina permanece sensível às proteases, e o tratamento com enzimas proteolíticas protege as células susceptíveis a ação da nisina contra seu efeito letal.

Na segunda etapa, a nisina se torna insensível às proteases e as células sofrem mudanças irreversíveis. Ela é fortemente atraída pelos fosfolipídeos e lisossomos na membrana das bactérias, formando poros ou canais de 0,2-1,0 nm de diâmetro. A despolarização simultânea da membrana causa um efluxo rápido de componentes essenciais, como íons K^+ , aminoácidos e ATP, levando a uma série de alterações que termina com a lise celular.

O estado fisiológico da cultura sensível tem grande influência na susceptibilidade à ação das bacteriocinas, sendo as células metabolicamente ativas mais sensíveis. A inibição da célula persiste enquanto houver bacteriocina ativa remanescente no meio de crescimento (33).

Bierbaum e Sahl (5) relataram que algumas espécies de *Staphylococcus* sp., tratadas por longo tempo com nisina, foram capazes de induzir a autólise celular.

O mecanismo pelo qual a nisina impede a germinação de esporos é diferente do das células vegetativas. Acredita-se que os grupos reativos Dha e Dhb da nisina interajam com grupos sulfidril vitais presentes na membrana de esporos recém-germinados e exerçam um profundo efeito bacteriostático, resultando na inibição subsequente do esporo. Assim, a nisina permite a germinação do esporo, mas inibe as etapas posteriores do processo de formação de novas células (35).

Além de demonstrar atividade sobre bactérias gram-positivas, especialmente na forma de esporos, a nisina tem também mostrado-se efetiva sobre bactérias gram-negativas e fungos quando usada em combinação com outro composto, como um agente quelante (6).

Nas bactérias gram-negativas, a presença da camada de lipopolissacarídeo oferece maior proteção à célula, não permitindo que agentes externos alcancem a membrana citoplasmática. A camada de lipopolissacarídeo é formada por compostos que possuem caráter aniônico, gerando uma superfície hidrofílica (22). Desse modo, a membrana externa repulsa substâncias hidrofóbicas e macromoléculas, como a nisina. No entanto, pelo caráter aniônico da camada de lipopolissacarídeo, esta pode se ligar à molécula da nisina, que tem caráter catiônico, formando uma estrutura estável por interações eletrostáticas, mas mesmo assim, a nisina não conseguiria alcançar a membrana citoplasmática da célula (22).

Cleveland et al. (13) relataram a efetividade da nisina sobre bactérias gram-negativas quando combinada com ácido láctico.

Segundo Helander e Sandholm (22), o EDTA é o agente quelante mais efetivo que, adicionado juntamente com a nisina, auxilia na inibição de bactérias do grupo das gram-negativas, porém Gill e Holley (20) observaram a ineficiência da atuação sobre estas bactérias quando estudaram a possibilidade de sinergismo misturando EDTA e nisina. Eles justificaram que o experimento foi conduzido em caldo de nutriente, sem limitações para os microrganismos, fato que não é verdadeiro nas condições reais de atuação sobre alimentos. Quando avaliaram bactérias gram-positivas foi observado um efeito sinérgico.

Coma et al. (14) relataram que a nisina tem sua atividade reduzida quando em contato com gordura. Dean e Zottola (17) usaram nisina para inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* em sorvete, e verificaram que a nisina tinha maior atividade no sorvete contendo 3% de gordura comparado com o sorvete que continha 10%.

Em seu experimento, Liu e Hansen (29) trabalharam com a nisina estocada em ambiente escuro, tendo sempre o cuidado ao manipulá-la de evitar o seu contato com a luz para que não se formassem radicais livres de resíduos de deídros. Nada mais concreto foi encontrado para essa revisão que confirmasse a degradação da nisina pelo contato com a luz.

Liu e Hansen (29) suportam a teoria de que os resíduos de deídros podem desempenhar um papel importante na propriedade antibacteriana da nisina, pela reação com um ou mais nucleofílicos num alvo sensível de uma célula. Após a reação com os compostos nucleofílicos, que modificam os deidrogupos dos resíduos de Dha e Dhb, a nisina perde a atividade biológica (40). Outra teoria para a perda dessa atividade é de que a enzima nisinase tem uma ação como a de um deidropeptídeo redutase sobre a nisina (25). Com essas características, a nisina tem grande valor como aditivo de aplicação direta em alimentos para controle microbiano de bactérias e esporos.

Zottola et al. (48) mostraram que a adição de nisina em queijos processados com diferentes teores de umidade foi um método efetivo de controle do crescimento de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *C. sporogenes*. Foi observado ainda, neste estudo, que a nisina não perdeu a sua atividade antimicrobiana, mesmo quando submetida ao tratamento térmico aplicado a estes tipos de queijos.

Natrajan e Sheldon (36) combinaram a ação da nisina com a do ácido cítrico, EDTA e Tween 80, e obtiveram redução da população de *S. typhimurium* de até 4,8 ciclos logarítmicos na contagem de mesófilos aeróbios em superfície de carcaças de frango, após 96 horas de exposição, a 4°C.

Diversos compostos sintéticos e naturais têm sido explorados na indústria de embalagens, a exemplo de ácidos orgânicos, extratos de condimentos, bacteriocinas, agentes quelantes, antibióticos e enzimas com finalidade de inibir microorganismos (24).

O número de pesquisas sobre o uso de bacteriocinas e derivados antimicrobianos em material de embalagem tem aumentado nos últimos tempos e muitas patentes têm sido registradas nesta área (45).

A adsorção da nisina na superfície de filmes plásticos (polietileno/poliamida) e a base de celulose foi proposta por Scannell et al. (42). A aplicação desses filmes antimicrobianos em embalagem com atmosfera modificada para queijos e presuntos fatiados mostrou reduções significativas sobre as populações de bactérias lácticas, *Listeria innocua* e *S. aureus*, quando comparada ao tratamento de controle.

Dawson et al. (16) usaram nisina e lisozima em filme de proteína de soja e milho para inibir o crescimento de suspensões de *Lactobacillus plantarum* e *Escherichia coli*. *Lactobacillus plantarum* foi inibido pelo filme contendo nisina ou lisozima, e a adição de EDTA aumentou o efeito inibitório dos filmes sobre *E. coli*.

Siragusa et al. (45) incorporaram nisina em filme de polietileno e observaram uma redução de 1,4 ciclo logarítmico no crescimento de *Brochothrix thermosphacta* na superfície de bifes embalados a vácuo quando comparado com filmes sem incorporação de nisina.

Sebti e Coma (44) incorporaram nisina em filme de hidroxipropilmetilcelulose e, por este ser altamente hidrofílico, adicionaram ácido esteárico para diminuir a barreira à umidade. Estudos realizados por esses autores mostraram que o efeito antimicrobiano do filme foi reduzido, indicando uma possível interação entre a nisina e o ácido esteárico.

Melo (32), em seus estudos, observou que nisina incorporada em filme de base celulósica aumentou a vida de prateleira de coalho de queijo, sendo observada uma diferença de 2 ciclos log na contagem de *Staphylococcus* sp., comparando amostras cobertas com filme com bacteriocina e filmes com ausência desta.

Devido às limitações do espectro de atuação das bacteriocinas tem sido estudado seu efeito sinérgico combinando bacteriocinas que atuam de forma diferenciada (20) e outros agentes antimicrobianos, seja aditivos ou em tratamentos (tecnologia de barreiras) (19).

Gill e Holley (20) avaliaram o efeito sinérgico da nisina juntamente com a lisozima sobre microrganismos gram-positivos em caldo de nutriente, porém não identificaram nenhum efeito sinérgico.

Carne de porco fatiada, imersa em solução de nisina com ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico), apresentou maior efeito antilisterial quando comparada carne imersa em solução de nisina pura (41).

Lee et al. (27) e Lee et al. (28) desenvolveram embalagens ativas utilizando um copolímero de etileno-vinil acetato (EVA) coberto com nisina e α -tocoferol e nisina e/ou quitosana, respectivamente. Na primeira embalagem, o objetivo foi conferir propriedades antimicrobiana (nisina) e antioxidante (α -tocoferol). Esta embalagem foi testada em emulsão-modelo

(66% água, 32% óleo de parafina e 2% de emulsificante) adicionada de *Micrococcus flavus*, para avaliação antimicrobiana, e de ácido linoleico para avaliar a atividade antioxidante. Avaliou-se também a atividade antimicrobiana na microbiota do creme de leite estocado a 10°C. A embalagem apresentou eficiência antimicrobiana sobre o microrganismo testado e efeito antioxidante na emulsão e no creme de leite. O α -Tocoferol migrou em maior taxa que a nisina e atingiu o equilíbrio em torno de 6%, enquanto a nisina migrou 9% do teor incorporado inicialmente. Na segunda embalagem, avaliou-se seu efeito na estabilidade microbiana de leite pasteurizado e suco de laranja quanto às bactérias aeróbias e às leveduras, respectivamente, estocados a 3, 10 e 20°C. Os filmes adicionados de nisina ou quitosana apresentaram efeito antimicrobiano nos produtos acondicionados e estocados a 3 e 10°C, porém não foram eficientes naqueles que ficaram a 20°C. Também foi verificado maior efeito antimicrobiano quando os agentes foram combinados, principalmente na temperatura de 10°C (a 20°C não foi observado efeito inibitório).

CONCLUSÕES

1) A procura por alimentos processados que se assemelham aos naturais vem crescendo a cada dia, o que impulsiona ainda mais as pesquisas sobre a utilização dos biopreservativos. A nisina apresenta-se como um biopreservativo em potencial com uso aprovado para alguns alimentos. Vários pesquisadores vêm realizando estudos para ampliar a aplicação da nisina em outros produtos, seja adicionada diretamente no alimento, seja incorporada em materiais de embalagem.

2) Apesar do seu grande potencial antimicrobiano, o espectro de ação da nisina é limitado. Conhecendo estes fatos, inúmeros estudos vêm sendo realizados para compensar esta limitação. Pesquisadores têm trabalhado com a tecnologia de barreiras ou alterando as condições do meio onde a bacteriocina vai atuar, adicionando quelantes para aumentar seu espectro de ação, por exemplo.

REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mercosul/GMC/Res. Nº 79/1994. Disponível em URL: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado 15 de janeiro de 2003.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mercosul/GMC/Res. Nº 82/1996
(a). Disponível em URL: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado 15 de janeiro de 2003
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mercosul/GMC/Res. Nº 134/1996
(b). Disponível em URL: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado 15 de janeiro de 2003
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mercosul/GMC/Res. Nº 136/1996
(c). Disponível em URL: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado 15 de janeiro de 2003

5. BIERBAUM, G. & SAHL, H.G. Induction for autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Archive Microbiology*, 141:249-54, 1985.
6. BOWER, C.K., PARKER, J.E., HIGGINS, A.Z., OEST, M.E., WILSON, J.T., VALENTINE, B.A., BOTHWELL, M.K. & McGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids and Surfaces*, 25:81-90, 2002.
7. BRANDÃO, L.S. Inibição da microbiota de exsudado de frango por nisina incorporada em sachês de celulose. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 54 p. (Dissertação de mestrado).
8. BRUNO, M.E.C., MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:3003-10, 1993.
9. BUYONG, N.; KOK, J. & LUCHANSKY, J.B. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM 217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12):4842-45, 1998.
10. CARMO, L.S. Intoxicação alimentar. *Minas faz Ciência (FAPEMIG)*, 11:25-7, junho a agosto, 2002.
11. CHEN, Y.; LUDESCHER, R.D. & MONTVILLE, T.J. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipids vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:4770-77, 1997a.
12. CHEN, Y.; LUDESCHER, R.D. & MONTVILLE, T.J. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:524-31, 1997b.
13. CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F. & CHIKINDAS, L.M. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71:1-20, 2001.
14. COMA, V.; SEBTI, I.; PARDON, P.; DESCHAMPS, A. & PICHAVANT, F.H. Antimicrobial edible packaging base on celulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, 64(4):470-5, 2001.
15. DAESCHEL, M. Applications and interactions bacteriocins form lactic acid bacteria in foods and beverages. In B.; DAESCHEL, M. (Ed.s) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. New York: Academic Press, 1992, p. 17-43.
16. DAWSON, P.I.; HAN, I.Y. & PADGETT, T.R. Effect of loric acid on nisin activity in edible protein packaging film. *Poultry Science*, 76:74, 1997.
17. DEAN, M. & ZOTTOLA, E.A. Use of nisin in ice cream and effect on the survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 59:476-80, 1996.
18. DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L. & DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations-Review. *International Dairy Journal*, 14:273-85, 2004.
19. DUFOUR, M.; SIMMONDS, R.S. & BREMER, P.J. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of "natural" antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 85:249-58, 2003.
20. GILL, A.O. & HOLLEY, R.A. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80:251-59, 2003
21. GUIOTTO, A.; POZZOBON, M.; CANEVARI, M.; MANGANELLI, R.; SCARIN, M. & VERONESE, F.M. PEGylation of antimicrobial peptide nisin A: problems and perspectives. *IL Farmaco*, 00:1-6, 2002.

22. HELANDER, I.M. & SANDHOLM, T.M. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2-3):153-61, 2000.
23. HIGAZI, A.A.R.; GANZ, T.; KARIKO, K. & CINES, D.B. Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. *Journal Biological Chemistry*, 271:17650-55, 1996.
24. HOTCHKISS, J.H. Safety considerations in active packaging. In: ROONEY, M.L. (eds.). *Active Food Packaging*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK. 1995. p. 238-255.
25. HURST, A. Nisin. *Advanced Applied Microbiology*, 27:85-123, 1981.
26. JACK, R.W.; TAGG, J.R. & RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Review*, 59(2):171-200, 1995.
27. LEE, C.H.; AN, D.S.; LEE, SOON C.; PARK, H.J. & LEE, D. SUN. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *Journal of Food Engineering*, 62:323-29, 2004a.
28. LEE, C.H.; PARK, H. J. & LEE, D. SUN. Influence of antimicrobial packaging on kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice. *Journal of Food Engineering*, 65:527-31, 2004b.
29. LIU, W. & HANSEN, J.N. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8):2551-8, 1990.
30. MARKARIAN, J. Additives in food packaging. *Plastics additives & compounding*, p.16-21, abril, 2002.
31. McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: Structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*, 25:285-308, 2001.
32. MELO, N.R. Avaliação de Embalagem Ativa por Incorporação de Nisina na Inibição de *Staphylococcus* sp.. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2003. 88 p. (Dissertação de mestrado).
33. MORENO, I.; LERAYER, A.L.S. & BALDINE, V.L.S. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. *Ciência Tecnologia Alimentos*, 19(1):23-8, 1999a.
34. MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINE, V.L.S. & LEITÃO, M.F.F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Microbiology*, 31:184-92, 2000.
35. MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S. & LEITÃO, M.F.F. Nisina no controle de bactérias esporogênicas em produtos lácteos. *Associação Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 33(2):215-28, 1999b (Boletim SBCTA).
36. NATRAJAN, N. & SHELDON, B.W. Efficacy of Nisin-Coated polymer films to inactivate *Salmonella Typhimurium* on fresh broiler skin. *Journal of Food Protection*. 63(9):1189-96, 2000.
37. NUNEZ, M.; RODRIGUEZ, J.L.; GARCIA, E.; GAYA, P. & MEDINA, M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal Applied of Microbiology*, 83:671-7, 1997.
38. OLIVEIRA, L.M. Filmes plásticos incorporados de agentes antimicrobianos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Embalagem, 2002. 14(2):4-7 (Boletim técnico do centro de tecnologia de embalagem).
39. QUINTAVALLA, S. & VICINI, L. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat science*, 62:373-80, 2002.
40. RAY, B. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* as a food biopreservative, p.207-264. In RAY, B.; DAESCHEL, M. (Ed.s) *Food biopreservatives of microbial origin*. New York: CRC Press, 1992. p.89-101.

41. SAMELIS, J.; BEDIE, G.K.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4 °C in vacuum packages. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*, 2004
42. SCANNELL, A.G.M.; HILL, C.; ROSS, R.P.; MARX, S.; HARTMEIER, W. & ARENDT, E.K. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lacticin 3147 and Nisaplin[®]. *Journal of Food Microbiology*, 60:241-9, 2000.
43. SCHOEMAN, H.; VIVIER, M.D.; DU, T.M.; DICKS, L.M. & PRETORIUS, I.S. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*ped A*) in *Sacharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15:674-6, 1999.
44. SEBTI, I. & COMA, V. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydrate Polymers*. 49:139-44, 2002.
45. SIRAGUSA, G.R.; CUTTER, C.N. & WILLET, J.L. Incorporation of bacteriocina in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiology*, 16:229-35, 1999.
46. TOLEDO, M. M. Crescimento de *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* NCK 400 e Produção de Nisina em Meio à Base de Extratos Vegetais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2000. 66 p. (Dissertação de mestrado).
47. WANG, G .H.. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Prot.* 55:916–19, 1992.
48. ZOTTOLA, E. A.; YEZZI, T.L.; AJAO, D. B. & ROBERTS, R. F. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1-2):227-38, 1994.