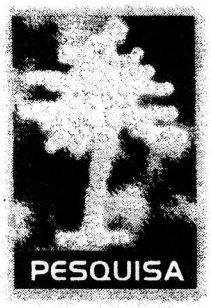

Bioconservação de Alimentos

Aplicação de bactérias láticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos

Elaine Cristina Pereira De Martinis
Professora doutora do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo
edemart@fcfrp.usp.br

Virgínia Farias Alves
Farmacêutica-Bioquímica
Mestranda do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo
valves@fcfrp.usp.br

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco*
Professora Associada do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo
bfranco@usp.br

*Autor para correspondência: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508-900, São Paulo - São Paulo, Brasil. Tel.: +55 11 30912191. Fax: +55 11 38154410.

Fotos cedidas pelos autores

1. Introdução

É notório que alimentos, industrializados ou não, podem conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos, que podem interferir em sua vida útil ou causar doenças. Existem inúmeros recursos para eliminar esses microrganismos ou controlar o seu desenvolvimento nos alimentos, incluindo tratamento térmico, adição de conservadores químicos, uso de baixa temperatura (refrigeração e congelamento) durante o armazenamento, entre outros. No entanto, a cada dia aumenta a procura por alimentos naturais, que não tenham sido submetidos a nenhum tipo de processamento industrial ou que sejam minimamente processados, e que não sejam adicionados de produtos químicos. Muitos consumidores consideram que esses procedimentos interferem na qualidade nutricional dos alimentos, além de acreditar que os conservadores químicos são perigosos para a saúde, até mais perigosos que os próprios microrganismos que esses produtos pretendem controlar (Muriana, 1996).

Com isso, aumenta também a preocupação dos fabricantes de alimentos em produzir alimentos que não necessitem desses procedimentos para que sejam saudáveis e para que atendam os parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores e fabricantes. Uma dessas estratégias é explorar a capacidade dos microrganismos inócuos, naturalmente presentes nos alimentos ou artificialmente adicionados, de inibir microrganismos que são indesejáveis, quer sejam deteriorantes, quer sejam prejudiciais a saúde. Esse processo denomina-se **bioconservação**, e vem sendo cada vez mais estudado devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados tipos de alimentos. Os microrganismos mais adequados para uso como bioconservadores são as bactérias láticas, devido a suas características antagonísticas e sua grande tradição de uso como bactérias grau-alimento em alimentos fermentados (Schillinger et al., 1996, De Martinis et al., 2002).

2. Bactérias láticas (BAL) em bioconservação

As bactérias láticas (BAL) compreendem um grupo amplo de microrganismos, mas que apresentam diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, anaeróbios, aerotolerantes, fastidiosos, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, apresentando o ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos (De Martinis et al., 2002).

As BAL podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de vários mecanismos: competição por oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonísticas, especialmente bacteriocinas. A produção de bacteriocinas tem sido verifi-

cada em bactérias láticas associadas a alimentos, incluindo representantes dos gêneros *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp e *Pediococcus* spp (De Martinis et al., 2002, Rosa et al., 2002).

Em alimentos, a multiplicação ou sobrevivência de microrganismos patógenos ou deteriorantes é determinada por fatores intrínsecos (pH, sal, conservadores, fatores antimicrobianos naturais) e extrínsecos (período de armazenamento, atmosfera da embalagem) que podem atuar como barreiras para multiplicação de microrganismos. O conhecimento e utilização combinada desses fatores em um alimento formam os fundamentos da teoria dos obstáculos (*hurdle technology*), que permite controlar a vida de prateleira, a estabilidade microbiológica, bem como impedir a multiplicação e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes (De Martinis et al., 2002).

Em contraste com barreiras biostáticas, que simplesmente inibem a multiplicação de microrganismos contaminantes, as bacteriocinas podem ser usadas como barreiras bactericidas e ajudar a reduzir a susceptibilidade de alimentos à multiplicação de microrganismos patogênicos (De Martinis et al., 2002).

A habilidade de BAL produtoras de bacteriocinas e/ou suas proteínas antimicrobianas em inibir *Listeria monocytogenes* e outros organismos Gram positivos patogênicos pode promover uma maior segurança microbiológica de alimentos processados. Seu uso em sistemas de bioconservação poderá não apenas suprir a demanda dos consumidores por conservadores naturais, mas também pode ser considerada uma medida de segurança adicional aos produtos minimamente processados, que dependem apenas de refrigeração como meio de conservação (De Martinis et al., 2002).

3. Fundamentos da aplicação de bacteriocinas de bactérias láticas em bioconservação.

O uso de bacteriocinas pode ser considerado uma "tecnologia biológica" com uso potencial em sistemas alimentares. As bacteriocinas contrastam com os antibióticos, considerados ilegais como conservadores pelo fato de não apresentarem utilização no tratamento de doenças clínicas infecciosas. Os antibióticos são formados por reações de condensação enzimática de aminoácidos, enquanto as bacteriocinas são peptídeos ou proteínas com atividade antibacteriana sintetizados ribossomicamente, não sendo letais para as células que as produzem (De Martinis et al., 2002).

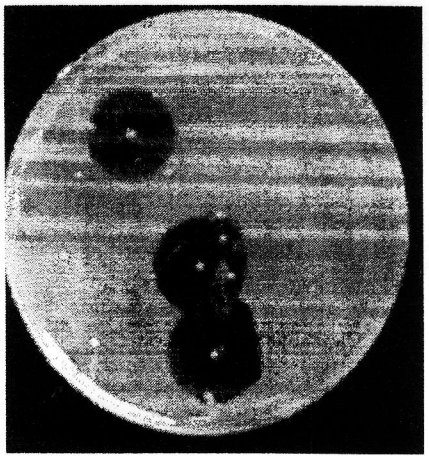

Figura 1: Zonas de inibição observadas em placas de ágar MRS proveniente de uma amostra de salsicha, utilizando *Lactobacillus sake* ATCC 15521 como microrganismo indicador (Autoria: E.C.P. De Martinis)

As bacteriocinas de BAL investigadas até o momento diferem em seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. Entretanto, a maioria delas possui baixo peso molecular (3 a 10 KDa), alto ponto isoelétrico, e contêm regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (De Martinis et al., 2002).

Segundo Klaenhammer, 1993, as bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes:

Classe I: pequenos peptídeos (<5kDa), contendo aminoácidos incomuns como dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina e β-metillantionina. Exemplos: nisina, lactacina 481, carnocina UI49 e lactocina S.

Classe II: pequenos peptídeos (<10 kDa) hidrofóbicos, termoestáveis e que não contêm lantionina. A bacteriocinas maduras dessa classe formam hélices anfifílicas com hidrofobicidade variável, estrutura de β-folha e estabilidade térmica moderada (100°C) a alta (121°C). Dentro dessa classe podem ser definidas três subclasses:

IIa: Peptídeos ativos contra *Listeria*, com uma seqüência N-terminal comum, composta por -Tir-Gli-Asn-Gli-Val-Xaa-Cis. Exemplos: pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, bavaricina MN e curvacina A.

IIb: Peptídeos formadores de poros na membrana celular, constituídos de duas subunidades importantes para a atividade. Exemplos: lactococina G, lactococina M e lactacina F.

IIc: Peptídeos ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos. Exemplo: lactacina B.

Classe III: grandes proteínas termolábeis (>30 kDa). Exemplos: helveticina J, helveticina V-1829, acidofilina e lactacinas A e B.

Classe IV: bacteriocinas complexas, compostas por uma fração protéica e frações lipídicas ou glicídicas. Exemplos. plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 e pediocina SJ1.

Existem outras propostas de classificação de bacteriocinas de bactérias láticas e a pesquisa na área de bacteriocinas é muito dinâmica, devendo ser necessário algum tempo até que um sistema de classificação definitivo seja obtido (De Martinis et al., 2002).

A seleção de BAL produtoras de bacteriocinas a partir de alimentos geralmente é feita pela semeadura de diluições decimais seriadas do alimento em placas de ágar contendo meio seletivo. Em seguida, coloca-se uma sobrecamada, composta de meio de cultura contendo um microrganismo sensível, e incuba-se em temperatura adequada pelo tempo necessário para observação da presença de colônias com atividade antagonística, conforme mostra a Figura 1. Deve-se usar simultaneamente testes adicionais que permitam excluir a possibilidade da inibi-

Tabela 1. Lista parcial de BAL e suas bacteriocinas.

Linhagem produtora	bacteriocina
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	nisina
Lactobacillus reuteri	reuterina
Lactobacillus sakei Lb 706	sakacina A
Lactobacillus sakei 148	sakacina M
Lactobacillus sakei CTC 494	sakacina K
Lactobacillus sakei LTH 673	sakacina P
Lactobacillus sakei Lb 674 e *Lactobacillus sakei* Lb 16	sakacina 674
Lactobacillus sakei MN	sakacina MN
Lactobacillus sakei 251	sakacina B
Lactobacillus sakei L45, *Lactobacillus sakei* 148, *Lactobacillus sakei* V18	lactocina S
Lactobacillus curvatus LTH 1174	curvacina A
Lactobacillus bavaricus	bavaricina A
Enterococcus faecium CTC 492	enterocina A
Enterococcus faecium DCP 1146	enterocina 1146
Enterococcus faecium T136	enterocinas A e B
Enterococcus faecium L50	enterocinas L50A e L50B
Leuconostoc gelidum A-UAL 187	leucocina A-UAL
Leuconostoc mesenteroides TA33a	leucocina TA33a
Leuconostoc carnosum B-TA11a	leucocina B-TA11a
Leuconostoc curvatus FS47	curvaticina FS47
Carnobacterium piscicola KLV17B	carnobacteriocinas B1 e B2
Carnobacterium piscicola JG126	piscicolina 126
Carnobacterium divergens 750	divergicina 750
Pediococcus acidilactici PAC1.0, JD, H, E, F, M, *Pediococcus pentosaceus* Z102	pediocina PA1
Pediococcus acidilactici L50	pediocina L50
Carnobacterium divergens 750	divergicina 750
Carnobacterium piscicola mutante LV17A	carnobacteriocina A
Carnobacterium piscicola mutante LV61	piscicolina 61

Fonte: De Martinis et al., 2002.

ção ter sido devida à produção de ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio ou a presença de bacteriófagos líticos (De Martinis et al., 2002).

As cepas com atividade antagonística isoladas devem ser, em seguida, submetidas a ensaios confirmatórios da atividade inibitória. Entre os métodos para confirmação, podemos destacar os seguintes:

a) difusão em poços: os sobrenadantes de culturas supostamente produtoras de bacteriocinas são colocados em orifícios cortados em uma placa de ágar semeado com um organismo sensível (indicador). Durante a incubação, a bacteriocina difunde-se pelo ágar, inibindo o crescimento do indicador e formando um halo ao redor do orifício (Figura 2).

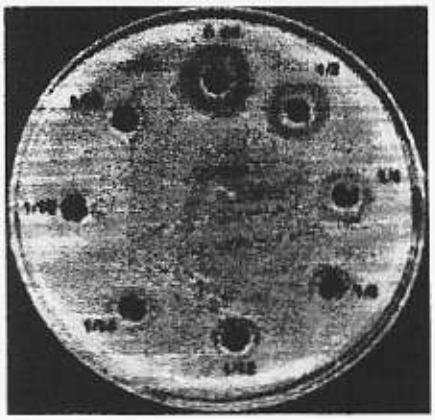

Figura 2: Foto de placa de ensaio de diluição crítica para quantificação da bacteriocina 2a produzida por *L. sake* 2a pelo método da difusão em poços, utilizando *L. monocytogenes* como microrganismo indicador (Rosa, 2001)

b) "flip-streak": as bactérias teste são semeadas em estrias na superfície de um meio sólido, invertendo-se em seguida esse meio. O organismo sensível à bacteriocina é então semeado no lado inverso do ágar. Durante a incubação, verifica-se a inibição do crescimento do microrganismo sensível (Figura 3).

c) "spot-on-the-lawn": as culturas teste são semeadas como um ponto na superfície de um meio de cultura sólido adequado contendo ágar. Após a incubação dessa placa, adiciona-se uma camada de um indicador sensível, observando-se a inibição de seu crescimento após uma nova incubação (Figura 4a).

A sensibilidade do inibidor à enzimas proteolíticas pode ser determinada empregando-se uma modificação da técnica "spot-on-the-lawn". Nessa técnica, antes de se adicionar a sobre-

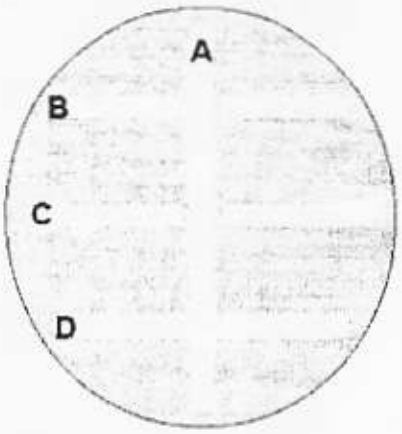

Figura 3: Representação esquemática de um ensaio "flip streak" mostrando: (A) cultura produtora de bacteriocina, (B) e (C) culturas sensíveis à bacteriocina, (D) cultura não sensível à bacteriocina

camada com o microrganismo indicador, adicionam-se ao meio proteases, além de água destilada como controle negativo (Figura 4b).

4. Mecanismo de ação das bacteriocinas de bactérias láticas.

O mecanismo para a atividade das bacteriocinas sobre células vegetativas não está totalmente esclarecido, mas envolve ação sobre a membrana celular. Bacteriocinas pertencentes às quatro classes de Klaenhammer (1993) são capazes de causar o colapso da força próton motriz em células vegetativas, sugerindo um modo de ação comum, conforme demonstrado por Bruno e Montville (1993). A força próton-motriz está relacionada com um grande número de processos de membrana que envolvem dispêndio energético.

A força próton-motriz pode ser expressa como segue:

$$PMF = \Delta\psi - Z\,\Delta pH$$

onde, PMF= força próton-motriz, $\Delta\psi$ = potencial de membrana, Z = 2,3 RT/F, sendo R a constante dos gases, T a temperatura absoluta e F a constante de Faraday.

Há dúvidas, entretanto, se o colapso da força próton-motriz é um evento primário ou secundário e também se a desestabilização da membrana celular ocorre pelo mecanismo de formação de poros ou pela ação detergente. A Figura 5 esquematiza os dois principais mecanismos propostos para o colapso da força próton-motriz. O mecanismo de formação de poros é o mais aceito porque uma solubilização generalizada como conseqüência da ação detergente ocasionaria a lise total das células, levando a um colapso repentino dos parâmetros bioenergéticos, não sendo compatível com a cinética de saturação observada (Montville et al., 1995). Para a formação de poros, há dois modelos propostos, conforme ilustrado na Figura 6.

No caso da ação da bacteriocina nisina sobre esporos, a germinação é impedida pela reação de grupamentos dehidrobutirina e dehidroalanina com moléculas sulfidrila vitais da membrana, conforme mostrado na Figura 7 (De Martinis et al., 2002).

Um fato importante a ser considerado é a possibilidade de aparecimento de células resistentes a bacteriocinas, já observadas entre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (De Martinis et al., 2002). Os mecanismos para resistência a bacteriocinas podem envolver sua destruição por proteases ou uma "bacteriocinase" específica, modificação estrutural ou, ainda, alteração da composição da membrana da célula alvo (Montville et al., 1995).

Para diminuir a freqüência do aparecimento de microrganismos resistentes a bacteriocinas em alimentos é necessário o controle da concentração de cloreto de sódio, do pH e da temperatura de armazenamento desses alimentos (De Martinis et al., 2002).

5. Emprego de bacteriocinas em alimentos

Apesar do grande número de trabalhos de pesquisa sobre a aplicação de bacteriocinas de BAL em bioconservação, o uso efetivo desses compostos em alimentos ainda é bastante limitado.

A nisina é a única bacteriocina disponível comercialmente para utilização em alimentos. Esta bacteriocina é

Figura 4: Teste de sensibilidade a proteases referente à cepa *Lactobacillus sake* 2a (determinado pela técnica "spot-on-the-lawn"). **a)** adição de 20 µL de água destilada estéril adjacente ao ponto de inoculação da bactéria produtora; **b)** adição de protease (20 µl, 20 mg/mL) e **c)** adição de α-quimotripsina (20 µL, 20 mg/mL) (De Martinis, 1997)

produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e seu nome é derivado de "group N inhibitory substance", porque *L. lactis* anteriormente era classificado como *Streptococcus* do grupo N de Lancefield. Essa bacteriocina é atóxica, destruída por enzimas digestivas e não confere

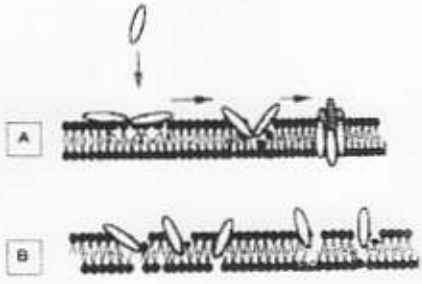

Figura 5: Interação de monômeros de bacteriocina (formas ovais) com a membrana citoplasmática de acordo com o mecanismo de formação de poros (A) e o modelo de ação detergente (B) (retirado de Montville et al., 1995, com permissão de Elsevier Science)

sabores e odores desagradáveis aos alimentos. A nisina pertence à classe dos lantibióticos, sendo composta por 34 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 3510 Daltons, podendo apresentar-se na forma de dímeros e tetrâmeros (De Martinis et al., 2002).

A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura/Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 Unidades Internacionais/kg de peso corpóreo. Diversos países permitem o uso de nisina em produtos como leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis (De Martinis et al., 2002).

No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijo no limite máximo de 12,5 mg/kg e nosso país é pioneiro na utilização dessa bacteriocina em produtos cárneos, sendo permitida a sua aplicação na superfície externa de salsichas de diferentes tipos. O produto pode ser aplicado como solução comercial de nisina a 0,02% em solução de ácido fosfórico grau alimentício (De Martinis et al., 2002).

A aplicação de nisina em carnes é um assunto bastante controvertido. Ela foi avaliada por alguns autores, obtendo-se sucesso quando aplicada em superfícies de carnes, a fim de reduzir as contagens de *L. monocytogenes* (De Martinis et al., 2002). Davies et al., 1999, relataram que nisina, utilizada nos níveis de 6,25 a 25 µg/g, foi eficiente para controlar bactérias deteriorantes em embutido do tipo Bologna. Os resultados permitiram evidenciar ainda que a maior inibição foi obtida nas formulações com o menor conteúdo de gordura (25%) e na presença de difosfato como emulsificante.

Entretanto, a aplicação de nisina em carnes pode ser limitada devido à sua baixa solubilidade nesses produtos, à possibilidade de destruição por enzimas da carne crua e à ineficiência na inibição de todos os organismos patogênicos ou deteriorantes de importância em carnes (De Martinis et al., 2002). A efetividade da aplicação de nisina na superfície de salsichas, conforme preconizado pelo Ministério da Agricultura do Brasil, foi avaliada por Castro, 2002, que demonstrou que esse procedimento é pouco efetivo no controle de *L. monocytogenes* ou de microrganismos deteriorantes, incluindo psicrotróficos e bactérias láticas.

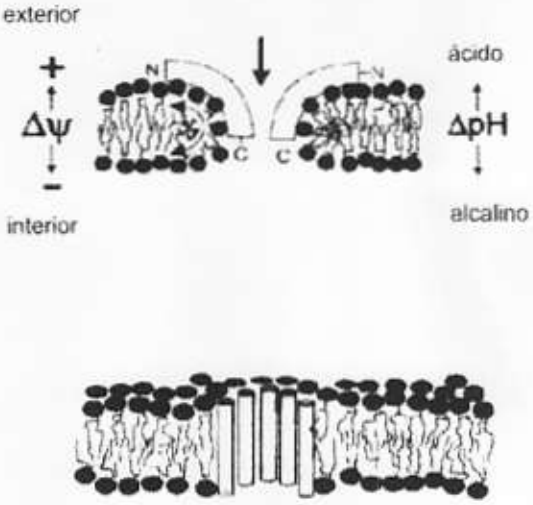

Figura 6: Modelos de formação de poros: (A) "wedge-like" e (B) "barrel-stave" (adaptado de Moll et al., 1999, com a gentil permissão de Kluwer Academic Publishers)

De modo geral, a nisina é ativa apenas frente a bactérias Gram positivas e seus esporos, não afetando as Gram negativas, bolores e leveduras. Postula-se que a parede das bactérias Gram negativas, composta por lipopolissacarídeos e proteínas (Figura 8), atua como uma barreira de permeabilidade celular, impedindo que a nisina atinja a membrana citoplasmática. Contudo, a presença de agentes quelantes, pressão hidrostática ou injúria celular podem desestruturar a parede, deixando a membrana celular exposta à ação da bacteriocina.

A aplicação de bacteriocinas em alimentos tende a ser mais eficiente quando as cepas produtoras são isoladas do próprio produto em que se pretende utilizá-las. Neste sentido, vários estudos sobre a aplicação de bactérias láticas produtoras de bacteriocina em produtos cárneos vêm sendo desenvolvidos no Brasil. De Martinis & Franco, 1998, demostraram que a bactéria *Lactobacillus sake* 2a, atualmente *Lactobacillus sakei*, produtora de bacteriocina e isolada de lingüiça frescal, apresenta atividade antilisterial em lingüiça frescal artificialmente contaminada. Esses autores verificaram que após quatro semanas a 8°C, o número de células de *monocytogenes* presente no produto cárneo co-inoculado

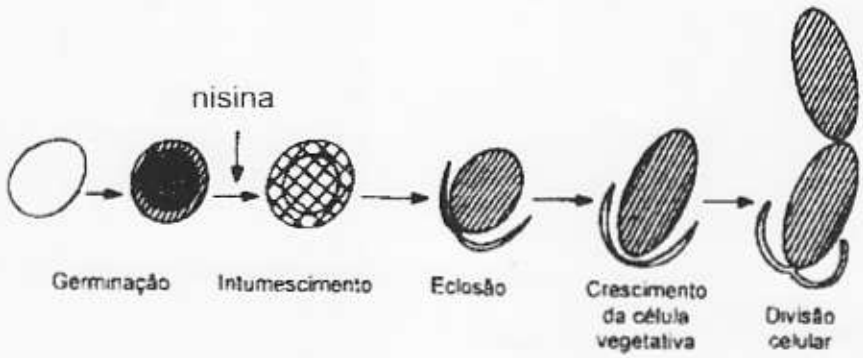

Figura 7: Diagrama representativo do crescimento de um endosporo dentro da célula vegetativa, mostrando estágio submetido a concentração mínima inibitória de nisina (modificado de Franco e Landgraf, 1996)

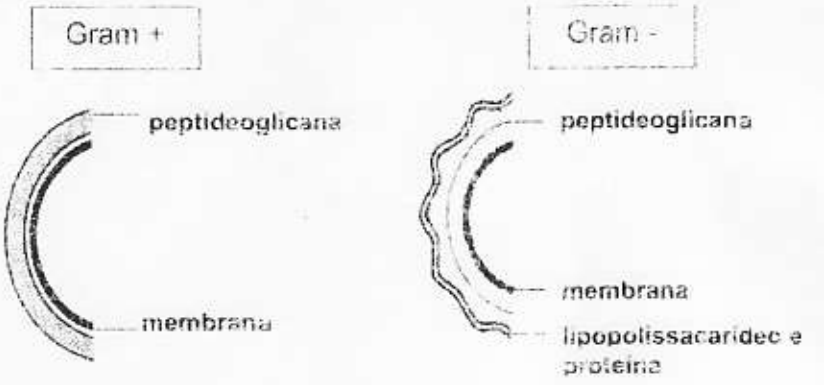

Figura 8: Esquema da parede celular de bactérias Gram negativas e Gram positivas

com *L. sake* 2a era cerca de 6 log inferior ao do controle, inoculado apenas com *L. monocytogenes*. Posteriormente, Rosa et al., 2002, demonstraram que essa bacteriocina apresentava modo de ação bactericida em meio de cultura. A atividade era mantida após aquecimento a 60°C por até 60 minutos, 100°C por 20 minutos e 121°C por 15 minutos. Após purificação por extração salina das células de *L. sake* 2a seguida de cromatografia de troca catiônica utilizando coluna Mono S, verificou-se que a bacteriocina 2a apresentava peso molecular estimado de 3 a 6 kDa. Por meio de compostos fluorescentes ("probes") foi demonstrado que a bacteriocina 2a forma poros na membrana citoplasmática das células alvo, apresentando o mesmo mecanismo de ação que as bacteriocinas da classe 2 de Klaenhammer, 1993.

Liserre e Franco, 2002, avaliaram o efeito combinado da embalagem em atmosfera modificada e da adição da cepa produtora de bacteriocina *L. sake* 2a na multiplicação de *L. monocytogenes* em linguiça frescal, embalada com filme plástico permeável ao oxigênio, 100% CO_2 ou 50% + 50%N_2 e mantida a 6°C. Os resultados indicaram que a embalagem em atmosfera modificada teve um efeito antilisterial mais acentuado que a adição de *L. sake* 2a produtor de bacteriocina. Entretanto, foi observado um efeito sinergístico quando *L. sake* 2a e embalagem em atmosfera modificada foram utilizados simultaneamente. Os autores ainda relataram que *L. sake* 2a não modificou as propriedades sensoriais das linguiças em nenhuma condição, por até 11 dias de armazenamento a 6°C.

As bactérias láticas bacteriocinogênicas e/ou suas bacteriocinas apresentam grande potencial para aplicação na garantia da segurança de produtos cárneos embalados a vácuo em nosso país, sendo uma alternativa interessante aos procedimentos tradicionais de conservação.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bruno, M.E.C.; Montville, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol., 59**: 3003-3010, 1993.

Castro, A.F. Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas, bactérias láticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina. São Paulo, 2002, 100p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).

De Martinis, E.C.P. Isolamento de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal. São Paulo, 1997. 94 p. (Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP).

De Martinis, E.C.P., Alves, V. F., Franco, B.D.G.M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International, 18** (2&3): 191-208, 2002.

De Martinis, E.C.P., Franco, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **Int. J. Food Microbiol., 42:** 119-125, 1998.

Franco, B.D.G.M., Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. p. 141.

Klaenhammer, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev., 12,** 39-86, 1993.

Liserre, A.M., Franco, B.D.G.M. Application of a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain to prevent growth of *Listeria monocytogenes* in Brazilian sausages (linguiça) packaged under modified atmosphere. **Meat Science, 61**(4): 449-455, 2002.

Moll, G.N.; Konings, W.N.; Driessen, A.J.M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, 76: 185-198, 1999.

Montville, T.J.; Winkowski, K.; Ludescher, R.D. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **Int. Dairy J., 5:** 797-814, 1995.

Moriana, P.M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **J. Food Prot., 59:** 54-63, 1996.

Rosa, C.M.; Franco, B.D.G.M.; Montville, T.J.; Cintkundas, M. Purification and mechanism action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sake* 2a. **J. Food Saf., 22:** 39-53, 2002.

Rosa, C.M. Purificação e mecanismo de ação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a isolado de linguiça frescal. São Paulo, 2001, p. (Tese de doutorado Faculdade de Ciencias Farmacêuticas, USP).

Schillinger, U.; Geisen, R.; Holzapfel, W.H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol., 7:** 158-164, 1996.

Spelhaug, S.R.; Harlander, S.K. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceous*. **J. Food Prot 52:** 856-862, 1989.