

# EFEITO DO TRATAMENTO COM CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO NA INATIVAÇÃO DE *BACILLUS SUBTILIS*

M.A. DA SILVA<sup>1</sup>, J.S. FERREIRA<sup>2</sup> e T.G. KIECKBUSCH<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciência e Tecnologia

<sup>2</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Engenharia Química

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos

E-mail para contato: mariana.silva@unifal-mg.edu.br

**RESUMO** – O uso do CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) como agente esterilizante é uma das técnicas mais promissoras para a esterilização de líquidos e materiais sólidos e tem recebido especial atenção de pesquisadores nas últimas décadas. Esta tecnologia apresenta potencial para substituir os processos químicos e térmicos utilizados atualmente, os quais são eficientes, porém podem promover danos ao material esterilizado. O presente trabalho investigou o efeito do CO<sub>2</sub>-SC em pressão de 300 bar, diferentes temperaturas (30 e 60°C) e tempos de tratamento (60, 120 e 180 min) na inativação de esporos de *Bacillus subtilis* inoculados em implantes-teste (placas de aço-inox, 1x1 cm). Ciclos de pressurização/despressurização e a adição de um agente antimicrobiano (nisina) também foram testados. Observou-se uma redução na concentração de esporos superior a 7 ciclos logarítmicos no tratamento com CO<sub>2</sub>-SC a 300 bar e 60°C em combinação com nisina e 4 ciclos de pressão (30 min cada,  $\Delta P = 300\text{bar}$ ).

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as técnicas de esterilização não-térmicas têm despertado um crescente interesse por parte das indústrias farmacêuticas e de alimentos com o intuito de garantir a segurança microbiológica dos produtos sem que haja deterioração da qualidade dos mesmos (Mun et al., 2011). Neste sentido, o uso da tecnologia de CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) tem sido amplamente reconhecido como um método de desinfecção alternativo bastante promissor, devido à possibilidade de se trabalhar em temperaturas e pressões moderadas.

O uso de CO<sub>2</sub> pressurizado como agente esterilizante tem demonstrado altas taxas de inativação para uma vasta gama de microrganismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Zhang et al. 2006). No entanto, o emprego de CO<sub>2</sub>-SC na esterilização de micro-organismos em sua forma vegetativa tem-se mostrado muito mais satisfatório do que na descontaminação de esporos bacterianos. Várias hipóteses tem sido propostas para explicar o mecanismo de inativação de microrganismos pela ação de fluidos pressurizados. Zhang et al. (2006) compilou uma extensa revisão de estudos de esterilização utilizando CO<sub>2</sub> pressurizado.

Diversos trabalhos na literatura têm proposto o uso de aditivos como forma de aumentar a eficiência de inativação de esporos bacterianos em processos de esterilização por CO<sub>2</sub>-SC (White *et*

*al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2009; Checinska *et al.*, 2011). Além disso, existe uma tendência crescente no sentido de se desenvolver tecnologias alternativas que possam ser aplicadas juntamente com conservantes naturais (Yuste *et al.*, 1998; Garriga *et al.*, 2002). A nisina é uma bacteriocina produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis*, e inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e esporos de *Clostridium* e *Bacillus* (Delves-Broughton, 1990). No entanto poucos trabalhos envolvendo a ação combinada do CO<sub>2</sub>-SC e nisina têm sido publicados até o presente momento (Li *et al.*, 2012).

O presente trabalho investigou o efeito do CO<sub>2</sub>-SC em diferentes temperaturas e tempos de tratamento na inativação de esporos de *Bacillus subtilis* inoculados em placas de aço inoxidável com a proposta de ser utilizado como método de esterilização não-térmico de implantes cirúrgicos. Ciclos de pressurização/despressurização e a adição de um antimicrobiano (nisina) também foram testados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A cepa em *slants* do *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) foi adquirida da Fundação André Tosselo (Campinas, Brasil). O dióxido de carbono líquido pressurizado (99,5%) foi fornecido pela White Martins Ltda (Campinas, Brasil). Todos os outros materiais e reagentes usados na preparação dos experimentos, na cultura do micro-organismo e na contagem são de grau analítico. O antimicrobiano nisina (Nisaplin<sup>®</sup>) foi gentilmente cedido pela empresa Danisco (Dinamarca). Os implantes-teste utilizados foram placas de aço inoxidável de 1 cm x 1cm.

### **2.2 Preparo da solução estoque de esporos**

Inicialmente, a cepa foi transferida do *slant* com auxílio de uma alça de cobre e estriada em aproximadamente 10 placas de Petri contendo ágar nutriente (Nutrient Agar, NA, ACUMEDIA 7145) contendo Mn<sup>2+</sup> para a esporulação. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48/72 h, e posteriormente, mantidas a temperatura ambiente por 7-10 dias. Após atingir um nível de esporulação de 90-99%, 2-3 mL de solução fisiológica salina (0,85% NaCl) foram adicionados às placas e a biomassa foi raspada e transferida para um frasco de centrifuga estéril e a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* de esporos foram transferidos para um frasco tipo *shot* contendo 50 mL de água destilada e esferas de vidro. Esta solução estoque de esporos foi mantida em geladeira a 4°C e foi utilizada para inocular a superfície dos implantes-teste.

Após o preparo, realizou-se a contagem do número de esporos viáveis na suspensão estoque pelo método de diluições decimais e contagem padrão em placas (Silva *et al.*, 2010). Para garantir a ativação dos esporos e a eliminação das células vegetativas realizou-se um choque térmico na suspensão (80°C/10 minutos, seguida de imersão em banho de gelo) antes da contagem. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 h. Uma carga inicial de aprox. 10<sup>9</sup> UFC/mL foi obtida.

### **2.3 Inoculação dos esporos na superfície dos implantes-teste**

Para a inoculação dos esporos de *Bacillus subtilis* na superfície dos implantes-teste, realizou-se a aplicação sequencial de três alíquotas de 50 µL da solução estoque de esporos com um tempo de secagem de 1 hora entre cada aplicação em câmara de fluxo laminar.

## 2.4 Contagem dos esporos viáveis na superfície dos implantes-teste

Para avaliar a eficiência do processo de esterilização, foram preparados (inoculados com esporos da bactéria) oito implantes-testes por experimento. Cinco são utilizados como controle e três usados para o tratamento com CO<sub>2</sub>-SC. Para a quantificação dos esporos viáveis, os implantes submetidos ao tratamento e os implantes controle foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de água peptonada 0,1% e esferas de vidro estéreis e agitados no vórtex por 30s até que os esporos que estavam aderidos na superfície dos implantes fossem totalmente transferidos para a solução. A contagem dos esporos viáveis foi determinada pela técnica de contagem padrão em placas de Ágar Triptona Glicose (Tryptone Glucose Extract Agar, TGE, 7242, Acumedia, EUA) após incubação por 48h a 35°C. A eficiência do processo de esterilização foi avaliada pelo número de unidades formadoras de colônia de esporos viáveis no controle (N<sub>0</sub>) e após o tratamento (N), expressa em termos de reduções decimais, ou seja, log (N<sub>0</sub>/N).

## 2.5 Tratamento com CO<sub>2</sub>-SC

Um aparato que opera em batelada, com controle independente de temperatura e pressão foi usado nos experimentos de esterilização. O equipamento foi projetado e construído pelo grupo de pesquisas de processos de fluidos supercríticos da FEQ/UNICAMP e pela AUTIC (Automação e Instrumentação Industrial Ltda., Brasil). Um suporte cilíndrico maciço de aço inoxidável (Figura 1) foi confeccionado para acomodar e introduzir os implantes-testes no reator diminuindo assim o volume vazio do reator e conseqüentemente reduzindo o tempo de pressurização do sistema. Antes de cada experimento, o sistema era esterilizado por meio da circulação de etanol 70% a 30°C por 30 minutos. A seguir, os implantes-teste (placas de aço inoxidável) eram transferidos para o suporte (Figura 1a) e colocadas cuidadosamente dentro do reator (Figura 1b). A tampa do reator era fechada em condições estéreis e todo o sistema era aquecido por uma resistência elétrica. Quando a temperatura desejada era atingida, a bomba era ligada, a válvula de entrada era aberta e a de saída fechada, assim o fluido preenchia o reator. Quando a pressão desejada era atingida, a válvula de entrada era completamente fechada e a bomba era desligada. Passado o tempo de tratamento, a válvula de saída, era imediatamente aberta até a descarga completa do sistema. O suporte era então retirado em condições assépticas e os implantes-teste eram coletados para posterior contagem microbiológica.

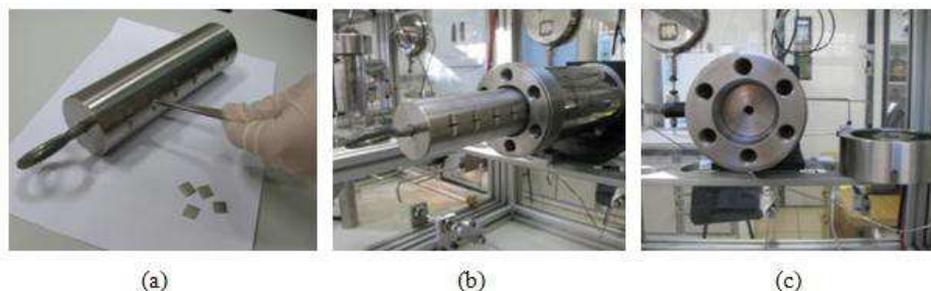


Figura 1 - Suporte para acomodação dos implantes de metal: (a) detalhe dos orifícios para disposição dos implantes, (b) introdução do suporte no reator, (c) vista frontal do reator com o suporte.

### **2.5.1 Ensaios com realização de ciclos de pressão**

Os experimentos de esterilização que utilizaram ciclos de pressão foram realizados da mesma forma que os ensaios à pressão constante. Porém, depois de atingida a pressão máxima do ensaio, esta foi mantida por um determinado período de tempo e então a válvula de saída foi aberta para proporcionar uma rápida descompressão do sistema. Assim que a pressão atingia o nível mínimo desejado a válvula de saída foi imediatamente fechada e a válvula de entrada foi aberta permitindo o bombeamento com CO<sub>2</sub> até a pressão máxima ser novamente atingida. Este procedimento foi repetido pelo número de ciclos programado para o experimento. Em todos os ensaios o tempo total de tratamento foi de 2 horas, a pressão máxima foi de 300 bar e a temperatura de 60°C.

### **2.5.2 Ensaios com adição de nisina**

Experimentos com CO<sub>2</sub>-SC a pressão de 300 bar, 4 ciclos de pressão de 30 minutos ( $\Delta P = 300\text{bar}$ ), temperatura de 60°C e com adição de nisina foram realizados com o intuito de aumentar a eficiência de esterilização. Para definição do volume e das concentrações da solução de nisina utilizadas nos testes de esterilização com CO<sub>2</sub>-SC, estudou-se o efeito da aplicação de soluções de nisina em diferentes concentrações (0, 0,01, 0,05, 0,10, 0,20 e 0,50%) na inativação dos esporos de *Bacillus subtilis* inoculados na superfície dos implantes metálicos. Após a inoculação e secagem da solução de esporos na superfície do implante, 100  $\mu\text{L}$  da solução de nisina foram aplicados sobre o implante. As placas foram então submetidas a contagem de esporos e os resultados foram comparados com o controle (sem nisina). Nos ensaios com CO<sub>2</sub>-SC, 100 $\mu\text{L}$  de solução de nisina (0,01% e 0,05%) foram aplicados na superfície do implante inoculado antes do tratamento do com CO<sub>2</sub>-SC.

## **2.6 Microscopia eletrônica de varredura**

As amostras foram preparadas conforme o procedimento a seguir. Os implantes metálicos inoculados com os esporos bacterianos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de água peptonada 0,1% e esferas de vidro. Alíquotas de 30  $\mu\text{L}$  da solução foram então depositadas na superfície de lamínulas de vidro (d=13 mm) em câmara de fluxo laminar. Após 2h, as amostras foram fixadas em 4% paraformaldeído/2.5% glutaraldeído/tampão fosfato pH 7,4 por 2 horas. Foram realizadas 3 lavagens de 15 min com tampão PBS gelado e 3 lavagens de 10 min com água deionizada. As amostras foram desidratadas em uma série de lavagens com etanol em concentrações crescentes: 50% (1x - 15 min), 70% (1x - 15 min), 95% (1x - 15 min) e 100% (2x - 15 min). As lamínulas foram então submetidas a secagem no secador de ponto crítico (BAL-TEC, CPD 030, Liechtenstein). Por fim, as lamínulas foram fixadas em suportes (*stubs*) de alumínio e recobertas com ouro a 25°C por 180s. A morfologia dos esporos foi avaliada utilizando-se um microscópio (LEICA, modelo DMLM, EUA) acoplado ao computador LEICA Q500IW.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nos primeiros ensaios de esterilização com CO<sub>2</sub>-SC avaliou-se o efeito da temperatura (30 e 60°C) e do tempo de tratamento na inativação dos esporos (1, 2 e 3 horas), mantendo-se constante a pressão de 300 bar (limite operacional do equipamento). Os resultados obtidos nestes ensaios estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que, nas condições testadas a redução na contagem dos

esporos foi muito baixa (menor que 1 ciclo logarítmico para todas as condições), demonstrando uma alta resistência dos esporos ao tratamento com CO<sub>2</sub>-SC. Entretanto, é possível observar um discreto aumento na eficiência de inativação com o aumento da temperatura e do tempo de tratamento.

Tabela 1 – Eficiência do tratamento com CO<sub>2</sub>-SC (300 bar) na inativação de esporos de *Bacillus subtilis* inoculados na superfície de implantes metálicos.

Tempo de tratamento (horas)	Temperatura (°C)	Contagem (UFC/mL)		log(No/N)*
		Antes do tratamento	Após tratamento	
1	30	3,12·10 <sup>7</sup>	2,84·10 <sup>7</sup>	0,04
1	60	3,20·10 <sup>7</sup>	2,18·10 <sup>7</sup>	0,17
2	60	2,68·10 <sup>7</sup>	1,05·10 <sup>7</sup>	0,41
3	60	3,56·10 <sup>7</sup>	1,10·10 <sup>7</sup>	0,51

\* (No/N) é a razão entre a contagem antes e após o tratamento.

White *et al.* (2006) não observaram nenhuma redução na população de esporos de *Bacillus subtilis* após o tratamento com CO<sub>2</sub> utilizando uma pressão de 100 bar por um período de até 72h em temperaturas de 50-60°C. Em outro trabalho, Spilimbergo *et al.* (2003) também observaram uma alta resistência de esporos de *Bacillus subtilis* em suspensão (10<sup>7</sup> UFC/mL) ao tratamento com CO<sub>2</sub>-SC. Até mesmo tratamentos prolongados (até 48h) à pressão de 120 bar e temperatura de 50°C não afetaram significativamente a sobrevivência dos esporos. No entanto, aumentando-se a temperatura para 75°C, um tratamento à pressão de 70 bar por 2 horas foi capaz de esterilizar totalmente a suspensão de esporos. No presente estudo não se considerou a possibilidade de testar temperaturas >60°C pois o objetivo seria validar um processo de esterilização para materiais termossensíveis.

Considerando os resultados obtidos nos ensaios apresentados na Tabela 1, estudou-se o efeito de ciclos de pressão no tratamento com CO<sub>2</sub>-SC sobre a resistência dos esporos. Os resultados obtidos nos ensaios com ciclos de pressão estão apresentados na Tabela 2. É possível observar que a utilização de ciclos de pressão aumentou a eficiência do tratamento, em relação aos tratamentos realizados à pressão constante (Tabela 1), porém o nível de inativação ainda não foi satisfatório.

Tabela 2 – Eficiência do tratamento com CO<sub>2</sub>-SC com ciclos de pressão e tempo total de tratamento de 2 horas (300 bar/60°C) na inativação de esporos de *Bacillus subtilis*

nº de ciclos	ΔP (bar)	Tempo*	Contagem (UFC/mL)		log(No/N)**
			Antes do tratamento	Após o tratamento	
4	300	30	3,00·10 <sup>7</sup>	1,19·10 <sup>6</sup>	1,40
8	300	15	3,03·10 <sup>7</sup>	2,88·10 <sup>6</sup>	1,02
16	300	7,5	3,44·10 <sup>7</sup>	1,03·10 <sup>6</sup>	1,52
30	100	4	3,80·10 <sup>7</sup>	2,50·10 <sup>6</sup>	1,18

\* tempo em que o sistema permanecia na pressão máxima.

\*\* (No/N) é a razão entre a contagem antes e após o tratamento.

Com o intuito de aumentar a eficiência de inativação dos esporos, realizou-se experimentos utilizando CO<sub>2</sub>-SC com adição de nisina. Inicialmente estudou-se o efeito da aplicação de soluções de nisina em diferentes concentrações na inativação dos esporos de *Bacillus subtilis* inoculados na superfície dos implantes metálicos. Os resultados (Tabela 3) demonstram uma redução de três ciclos log na população de esporos do *Bacillus subtilis* para os implantes que receberam a solução de nisina na concentração de 0,05% e a inativação completa foi obtida utilizando-se o aditivo na concentração de 0,20%.

Tabela 3 - Eficiência da aplicação de soluções de nisina, em diferentes concentrações, na superfície dos implantes inoculados com esporos de *Bacillus subtilis*.

Concentração da solução de nisina (%)*	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Contagem (UFC/mL)	log (No/N)**
0 (controle)	2,30·10 <sup>7</sup>	-----
0,01	3,30·10 <sup>6</sup>	0,84
0,05	1,44·10 <sup>4</sup>	3,20
0,10	8,70·10 <sup>4</sup>	2,42
0,20	ND	>7
0,50	ND	>7

\* 100 µL desta solução eram aplicados na superfície do implante teste.

\*\* (No/N) é a razão entre a contagem antes e após a aplicação da nisina.

ND -Não detectável.

Os resultados dos ensaios de esterilização combinando o uso da nisina com CO<sub>2</sub>-SC encontram-se na Tabela 4. Observa-se um efeito sinérgico entre o CO<sub>2</sub>-SC e a nisina, obtendo-se a inativação completa dos esporos no final do processo. Estes resultados apontam um potencial para o uso do processo de esterilização de implantes metálicos pela ação combinada do CO<sub>2</sub>-SC e da nisina em condições moderadas de pressão e temperatura e tempo de tratamento de 2h.

Tabela 4 - Eficiência dos tratamentos com CO<sub>2</sub>-SC/nisina realizando 4 ciclos de pressão de 30 minutos cada (300 bar/60°C) na inativação de esporos de *Bacillus subtilis*

Micro-organismo	Contagem (UFC/mL)			log(No/N) nisina*	log(No/N) nisina/CO <sub>2</sub> -SC**
	Antes		Após		
	Sem nisina	Com nisina			
<i>B. subtilis</i> <sup>a</sup>	2,73·10 <sup>7</sup>	9,2·10 <sup>5</sup>	ND	1,47	>7
<i>B. subtilis</i> <sup>b</sup>	3,75·10 <sup>7</sup>	1,15·10 <sup>5</sup>	ND	2,51	>7

ND - Não detectável.

\* log(No/N)<sub>nisina</sub> é a razão entre a contagem antes e após a aplicação da nisina.

\*\*log(No/N)<sub>nisina/CO<sub>2</sub>-SC</sub> é a razão entre a contagem antes e após o tratamento com CO<sub>2</sub> -SC.

<sup>a</sup> aplicação de 100µL da solução de nisina 0,01% na superfície do implante antes do tratamento com CO<sub>2</sub> -SC.

<sup>b</sup> aplicação de 100µL da solução de nisina 0,05% na superfície do implante antes do tratamento com CO<sub>2</sub> -SC.

As micrografias dos esporos de *Bacillus subtilis* inoculados na superfície dos implantes antes e após os diversos tratamentos com CO<sub>2</sub>-SC estão apresentadas na Figura 2. A exposição dos esporos a pressão, turbulência e ao fluido supercrítico sugere impactos na estrutura física das células. No entanto pela observação das micrografias dos esporos, percebe-se que os esporos totalmente inativados pelo tratamento com CO<sub>2</sub>-SC/nisina mantiveram-se intactos (Figura 2(c)). Estes resultados corroboram com os resultados de White *et al.* (2006) que não observaram alterações morfológicas por MEV em células de *Salmonella* inativadas por tratamento com CO<sub>2</sub>-SCa 96 bar/35°C/60 min contando 0,02% de ácido peracético e 0,8% de água. Resultados similares também foram encontrados para outros micro-organismos inativados por CO<sub>2</sub>-SC (Tarafa *et al.*, 2010, Dillow *et al.*, 1999).

Várias teorias têm sido propostas para o mecanismo de inativação bacteriana com CO<sub>2</sub>-SC, incluindo ruptura celular, acidificação, extração de lipídios de substâncias intracelulares (Spilimbergo e Bertucco, 2003). Destas teorias, a ruptura celular vem sendo descartada tendo em vista que a estrutura celular permanece intacta. Considerando as temperaturas relativamente baixas e as pressões moderadas utilizadas nos tratamentos por CO<sub>2</sub>-SC, outros componentes sugerem o modo de inativação dos esporos, incluindo o efeito da umidade que estaria contribuindo para melhorar a transferência de massa de CO<sub>2</sub> e a presença de aditivos (neste caso a nisina) que afetam a viabilidade celular. Estes fatores apontam a formação de ácido carbônico como uma etapa chave no processo de inativação. A acidificação pode ser responsável pela inativação microbiana através da acidificação do interior da célula e/ou da inativação de enzimas essenciais. Este transporte de massa facilitado pelo CO<sub>2</sub> no interior da célula pode colaborar também para aumentar a ação da nisina como agente esporicida, sendo esta hipótese consistente com o efeito sinérgico observado entre o CO<sub>2</sub>-SC e a nisina na inativação dos esporos bacterianos.

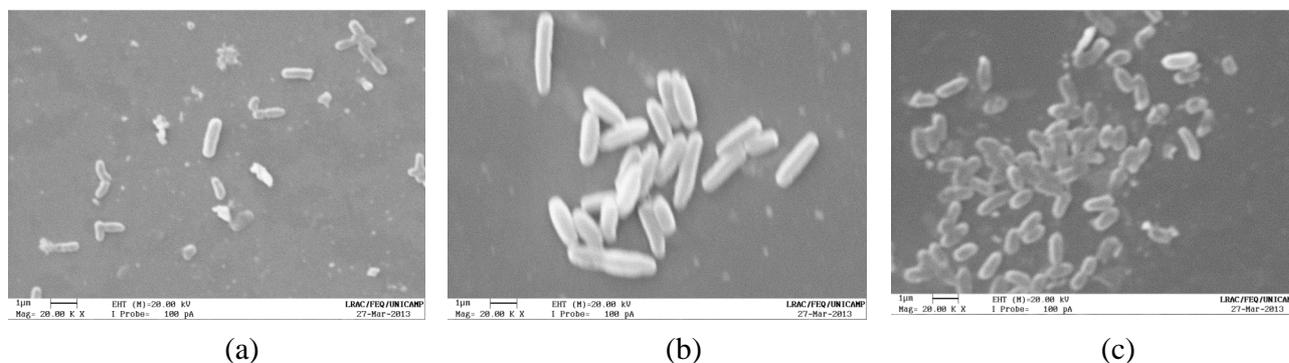


Figura 2 - Micrografias dos esporos de *Bacillus subtilis*: (a) sem tratamento, (b) após tratamento com CO<sub>2</sub>-SC (300 bar/4 ciclos de 30 min/60°C), (c) após tratamento com CO<sub>2</sub>-SC (300 bar/4 ciclos de 30 min/60°C/0,01% nisina na placa)

#### 4. REFERÊNCIAS

- CHECINSKA, A., FRUTH, I.A., GREEN, T.L., CRAWFORD, R.L., PASZCZYNSKI, A.J. Sterilization of biological pathogens using supercritical fluid carbon dioxide containing water and hydrogen peroxide. *J. Microbiol. Methods*, v. 87, p. 70–75, 2011.
- DELVES-BROUGHTON, J. Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Technol.*, v. 43, n. 3, p. 73-76, 1990.

- DILLOW, A.K., DEHGHANI, F., HRKACH, J.S., FOSTER, N.R., LANGER R. Bacterial inactivation by using near-and supercritical carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, v. 96, p. 10344-10348, 1999.
- GARRIGA, M., AYMERICH, M.T., COSTA, S., MONFORT, J.M., HUGAS, M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.*, v. 19, p. 509-518, 2002.
- LI, H.L., ZHAO, L., WU, J., ZHANG, Y., LIAO, X. Inactivation of natural microorganisms in litchi juice by high-pressure carbon dioxide combined with mild heat and nisin. *Food Microbiol.*, v. 30, p. 139-145, 2012.
- MUN, S., HAHN, J-S., LEE, Y-W., YOON, J. Inactivation behavior of *Pseudomonas aeruginosa* by supercritical N<sub>2</sub>O compared to supercritical CO<sub>2</sub>. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 144, p. 372-378, 2011.
- QIU, Q.-Q., LEAMY, P., BRITTINGHAM, J., POMERLEAU, J., KABARIA, N., CONNOR, J. Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant. *J. Biomed. Mat. Res. Part B: Appl. Biomat.*, v. 91, p. 572-578, 2009.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. 4 ed., Livraria Varela, São Paulo, 2010. 623 p.
- SPIILIMBERGO, S., BERTUCCO, A. Non-thermal bacterial inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 84, n. 6, p. 627-638, 2003.
- SPIILIMBERGO, S., BERTUCCO, A., LAURO, F.M., BERTOLONI, G. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, v. 4, n. 2, p. 161-165, 2003.
- TARAF, P.J., JIMÉNEZ, A., ZHANG, J., MATTHEWA, M.A. Compressed carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) for decontamination of biomaterials and tissue scaffolds. *J. Supercrit. Fluids*, v. 53, p. 192-199, 2010.
- WHITE, A., BURNS, D., CHRISTENSEN, T.W. Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide. *J. Biotechnol.*, v. 123, p. 504-515, 2006.
- YUSTE, J., MOR-MUR, M., CAPELLAS, M., GUAMIS, B., PLA, R. Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. *Food Microbiol.*, v. 15, p. 407-414, 1998.
- ZHANG, J., BURROWS, S., GLEASON, C., MATTHEWS, M.A., DREWS, M.J., LA BERGE, M., AN, Y.H. Sterilizing *Bacillus pumilus* spores using supercritical carbon dioxide. *J. Microbiol. Methods*, v. 66, p. 479-485, 2006.