

METÓDOS ALTERNATIVOS DE CONTROLE MICROBIANO

Alternative methods of microbial control

Marina Andreia de Souza^{1*}; Thais Comin¹; Thais Feiden¹; Andressa Arboit Fritzen¹; Caroline Chies Polina¹; Elisiane Galvagni¹; Bruno Fisher¹; Ilizandra Aparecida Fernandes¹; Roberta Cristina de Souza¹; Geciane Toniazco Backes¹; Rogério Luís Cansian¹

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim. Erechim-RS. *E-mail*: mariina.2010@hotmail.com*

Data do recebimento: 13/04/2019 - Data do aceite: 07/06/2019

RESUMO: A utilização de métodos inovadores de controle microbiológico em alimentos pode representar uma alternativa aos tradicionais, e tem se mostrado promissora para a obtenção do melhor compromisso entre segurança e qualidade na indústria alimentícia. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o emprego de óleos essenciais, ultrassom e dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) para controle de micro-organismos. Como micro-organismos modelo para todos os testes, utilizou-se *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva) e *Salmonella choleraesuis* (Gram-negativa). Foram avaliados os óleos essenciais de alecrim e orégano pelos métodos de difusão em placas e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Para os testes com ultrassom submeteu-se um caldo bacteriano a banho ultrassônico com potência de 154 watts, frequência de 40 kHz, com temperatura da água de 35°C, em diferentes tempos de exposição (30, 60 e 90 min). Para a avaliação do SC-CO₂, impregnou-se pedaços de mortadela com as bactérias e submeteu-se a uma pressão de 200 bar/min, por 120 minutos a 30°C. O óleo essencial de orégano demonstrou maior atividade que o óleo de alecrim e maior sensibilidade da bactéria Gram-positiva em relação à Gram-negativa no teste de difusão em placas. Na determinação da CIM, confirmou-se a maior atividade do óleo de orégano, porém com maior efeito sobre Gram-negativa. O tratamento com ultrassom não se mostrou eficiente sobre *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis* em nenhum dos tempos avaliados. O tratamento com SC-CO₂ mostrou-se satisfatório com redução de aproximadamente 3 Log UFC/g.

Palavras-chave: Ultrassom. Óleo essencial. Supercrítico. Micro-organismos.

ABSTRACT: The use of innovative methods of microbiological control in foods as an alternative to the traditional ones has shown to be promising to obtain the best commitment between safety and quality in the food industry. In this sense, the present work had the objective to evaluate the use of essential oils, ultrasound and supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) for the control of microorganisms. As model microorganisms for all tests, *Listeria monocytogenes* (Gram-positive) and *Salmonella choleraesuis* (Gram-negative) were used. The essential oils of rosemary and oregano were evaluated by plate diffusion methods and minimum inhibitory concentration (MIC) determination. For the ultrasonic tests, a bacterial broth was subjected to ultrasonic bath with a power of 154 watts, frequency of 40 kHz, with water temperature of 35°C, at different exposure times (30, 60 and 90 min). For SC-CO₂ evaluation, mortadella pieces were impregnated with the bacteria and subjected to a pressure of 200 bar/min for 120 minutes at 30 °C. Oregano essential oil showed higher activity than rosemary oil and greater sensitivity of Gram-positive to Gram-negative bacteria in the plate diffusion test. In the determination of MIC, the higher activity of oregano oil was confirmed, but with greater effect on Gram-negative. Ultrasound treatment was not efficient on *L. monocytogenes* and *S. choleraesuis* at any of the evaluated times. The treatment with SC-CO₂ was satisfactory with reduction of approximately 3 Log CFU/g.

Keywords: Ultrasound. Essential Oil. Supercritical. Microorganisms.

Introdução

A procura por tecnologias não convencionais para o processamento de alimentos vem ganhando cada vez mais espaço nas pesquisas. Como a alta qualidade é um dos desafios da indústria de alimentos, técnicas de preservação moderadas – capazes de reter a qualidade inicial dos alimentos e reduzir a carga microbiana – estão sendo consideradas interessantes por processadores de alimentos.

Alterações nos alimentos, causadas principalmente por micro-organismos, exigem novos processos de conservação dos alimentos, sejam isolados ou em associação, que visam a evitar essas alterações, possuindo como objetivos principais o aumento da vida útil e a melhoria da qualidade microbiológica e sanitária dos alimentos (SOUSA et al., 2012).

A resistência de micro-organismos às drogas tem aumentado nos últimos anos, gerando a necessidade de novos avanços. Assim, extratos e óleos essenciais vegetais podem ser uma alternativa para combater micro-organismos, pois são fonte de diferentes mecanismos antimicrobianos (YAP et al., 2014). Com isso, os óleos essenciais são utilizados em um amplo espectro de micro-organismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HELANDER et al., 1998).

Um dos métodos de conservação não térmica de alimentos que se destaca na indústria alimentícia é o de alta pressão com dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), propiciando benefícios do ponto de vista microbiológico e mantendo qualidade nutricional na produção de alimentos (SHINAGAWA et al., 2013). Embora o efeito antimicrobiano do SC-CO₂ tenha sido demonstrado principalmente para

produtos alimentares líquidos, alguns trabalhos de pesquisa investigaram a possibilidade de explorar o tratamento em alimentos sólidos. O método de preservação de SC-CO₂ oferece várias vantagens, pois o dióxido de carbono usado neste processo não é apenas um solvente potente para uma ampla gama de compostos de interesse no processamento de alimentos, mas é relativamente inerte, barato, não tóxico, não inflamável, reciclável e prontamente disponível em alta pureza, não deixando nenhum resíduo quando removido após o processo (WILLIAMS; CLIFFORD, 2000). Além disso, é considerado um solvente GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro para Alimentos), que significa que ele pode ser utilizado em produtos alimentares (FERRENTINO et al., 2014).

Com relação aos alimentos sólidos, o processamento a alta pressão tem sido utilizado para a preservação da carne de frango, carne de porco, surimi de salmão, com efeitos positivos consideráveis sobre a atividade de proteases, propriedades de textura, sabor e aroma (YAGIZ et al., 2009, CHOUHAN et al., 2015).

O ultrassom é um método amplamente investigado, responsável pela ruptura das paredes das bactérias, tornando-as mais suscetíveis à ruptura e inativação. O ultrassom pode ser combinado com outros tratamentos na indústria alimentícia, como calor e produtos químicos para inativar bactérias (BETTS et al., 2014). Além disso, foi relatado que este processo poderia ser eficaz na remoção de biofilme (SREY et al., 2013). O ultrassom apresenta um efeito de cavitação, que é formado por cavidades ou bolhas no meio líquido, resultando em uma certa quantidade de gás que pode levar a alterações estruturais ou funcionais nas células, devido à ruptura das ligações moleculares (JOSÉ; VANETTI, 2012). A energia gerada por este processo libera micro-organismos de biofilmes (JAY, 2005).

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo verificar a aplicabilidade das tecnologias alternativas, como o uso de óleos essenciais, ultrassom e dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) para controle microbiano contra cepas de *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva) e *Salmonella choleraesuis* (Gram-negativa).

Material e Métodos

Para avaliar o controle microbiano empregando diferentes tecnologias alternativas, como o uso de óleos essenciais de alecrim e orégano, ultrassom e dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂), foram selecionadas duas bactérias: *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Gram-positiva) e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 (Gram-negativa). As cepas foram mantidas refrigeradas a 4°C até o momento do subcultivo.

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

Para determinar a atividade antimicrobiana foram avaliados óleos essenciais comerciais de alecrim e orégano (Ferquima Ltda.) pelos métodos de difusão em placa e determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

No método de difusão em placas empregou-se o meio de cultura ágar Luria Bertani-LBA (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl e 10 g/L de ágar) e discos de papel Watmann nº 3, com 11 mm de diâmetro. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que cada placa continha um disco de controle negativo (sem óleo) e discos com diferentes volumes de óleo essencial (5, 15 e 25 µL). As placas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas e, posteriormente, medido o halo de inibição de

crescimento, considerando o diâmetro total do halo em mm (CANSIAN et al., 2010).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim e orégano foi realizada pela avaliação do crescimento microbiano em meio líquido Luria Bertani - LB (10 g/L de tripton, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl), contendo diferentes concentrações iniciais de cada óleo (3 e 4%), avaliando-se absorvância através do leitor automático de microplacas (Marca Bio-Tec Instruments Inc., modelo EL800), com comprimento de onda pré-selecionado de 490 nm. Cada micro-organismo foi inoculado em microplacas (ELISA) com 150 µL de caldo LB, acrescido de 2% do emulsificante dimetilsulfóxido (DMSO), com diluições sucessivas de cada óleo essencial (GAIO et al., 2015). Posteriormente ao processo de inoculação, as microplacas foram incubadas a 35-37°C por 24 horas.

A inibição do crescimento foi determinada pela diferença entre as leituras realizadas em 24 horas pela leitura realizada em 0 hora de incubação. Os valores médios de absorvância foram analisados estatisticamente pelo Excel para determinar a CIM.

Inativação de micro-organismos por ultrassom

Os experimentos de inativação microbiana por ultrassom foram realizados conforme metodologia descrita por Hamann et al. (2018). As bactérias foram incubadas em tubos de ensaio contendo caldo LB por 24 horas a 35-37°C. Em seguida, foram realizadas diluições (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) em água peptonada (0,1%) e então os tubos foram submetidos ao banho de ultrassom (Unique, Ultrasonic 2500) por 30, 60 e 90 minutos, com potência de 154 watts, frequência de 40 kHz, com temperatura da água de 35°C, além de um tubo controle sem tratamento ultrassônico mantido na mesma temperatura.

Após a exposição ao ultrassom, foi realizado o plaqueamento em superfície em meio LBA e incubados por 24 horas a 35-37°C, para posterior contagem das colônias e verificação da possível redução no número de unidades formadoras de colônias viáveis. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

Inativação de micro-organismos empregando dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂)

Inicialmente as bactérias foram incubadas individualmente em caldo LB por 24 horas a 35-37°C. Em seguida, 3g de mortadela foram contaminados com uma solução bacteriana de 20 mL com $1,0 \times 10^5$ UFC/g de *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*. As amostras foram submetidas a uma pressão de 200 bar/min, por 120 minutos a 30°C em uma célula de volume variável (SOARES et al., 2013). Posteriormente, as amostras de mortadela foram submetidas à análise microbiológica, com diluições sucessivas e plaqueamento em LBA e incubação por 24 horas a 35-37°C, sendo os resultados expressos em Log UFC/g.

Resultados e Discussão

Ação antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim e orégano

Difusão em discos

A Tabela I apresenta os resultados dos diâmetros totais dos halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de alecrim e orégano sobre *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*.

O óleo essencial de alecrim demonstrou atividade de inibição semelhante para as duas bactérias nas doses de 15 e 25 µL, mas sem atividade para *L. monocytogenes* na dose de 5 µL.

Já o óleo essencial de orégano apresentou maior atividade sobre *L. monocytogenes* em

Tabela I - Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos óleos essenciais de alecrim e orégano sobre *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*

Volume (µL)	Alecrim		Orégano	
	(Halo mm)		(Halo mm)	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. choleraesuis</i>
0	-	-	-	-
5	-	11,5	25,25	15
15	11,1	11,6	25,5	14
25	13,3	13	29	18,75

todas as doses avaliadas, indicando maior sensibilidade da bactéria Gram-positiva em relação à Gram-negativa para este óleo. Observa-se ainda uma maior inibição do óleo essencial de orégano em relação ao óleo de alecrim, independentemente da dose testada.

Determinação da concentração inibitória mínima

Na Tabela II apresentam-se os resultados da determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de alecrim e orégano sobre *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*.

Tabela II - Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais de alecrim e orégano sobre *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*

Micro-organismos	CIM (%)	
	Alecrim	Orégano
<i>S. choleraesuis</i>	1,00	0,38
<i>L. monocytogenes</i>	2,00	0,50

Observa-se que o óleo essencial de alecrim teve uma CIM menor para *S. choleraesuis* em relação à *L. monocytogenes*, corroborando os resultados obtidos na avaliação por difusão em placas, em que a dose de 5 µL já apresentava halo de inibição. O óleo essencial de orégano também foi mais eficiente sobre

S. choleraesuis, com comportamento inverso em relação aos resultados obtidos na difusão em placas. O óleo essencial de orégano confirmou a maior atividade antibacteriana em relação ao óleo de alecrim para ambas as bactérias, porém indicando maior sensibilidade da bactéria Gram-negativa em relação à Gram-positiva.

Observa-se não haver uma relação direta entre o diâmetro do halo de inibição e a concentração inibitória mínima. Estes resultados demonstram que este método de avaliação pode ser utilizado como método de avaliação prévio, por ser reconhecido e determinar a sensibilidade de muitos micro-organismos a determinados fármacos, produzindo resultados semiquantitativos, ainda que de acordo com alguns autores só qualitativos e nem sempre reprodutíveis (GAIO et al., 2015).

As bactérias Gram-negativas, como a *S. choleraesuis*, apresentam na sua estrutura uma parede composta por uma fina camada de polipeptidoglicano, enquanto as Gram-positivas, como a *L. monocytogenes*, apresentam uma parede composta por uma camada espessa de polipeptidoglicano. Por esse motivo, a *S. choleraesuis* foi mais afetada pela ação dos óleos essenciais de alecrim e de orégano (MARTINS et al., 2001).

Inativação de micro-organismos empregando ultrassom

O efeito do ultrassom nos micro-organismos é devido à alta potência de radiação, pois pode deslocar, distorcer ou reorganizar as partículas intercelulares em relação a suas configurações normais. Esses efeitos estão diretamente associados às tensões hidrodinâmicas suficientes que causam danos às células e macrócélulas suspensas (FONTANA et al., 1996).

A Tabela III apresenta os resultados do tratamento com ultrassom sobre a contagem dos micro-organismos (UFC/mL).

Tabela III - Contagem de *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis* em relação ao tempo de exposição ao ultrassom

Tempo (min)	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/mL)	<i>S. choleraesuis</i> (UFC/mL)
0	1,1x10 ⁶	>1,0x10 ⁸
30	9,6x10 ⁷	>1,0x10 ⁸
60	1,7x10 ⁷	>1,0x10 ⁸
90	5,1x10 ⁷	>1,0x10 ⁸

Os tratamentos com ultrassom não demonstraram ação bactericida para as duas bactérias avaliadas, pois quando se comparam os resultados obtidos em diferentes tempos 30 60 e 90 minutos, comparados com o tempo 0, nota-se que não houve diminuição da contagem microbiana.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bhat; Goh (2017), em que não foi possível observar redução significativa da contaminação microbiológica ao tratar suco fresco de morango com ultrassom (25 kHz por 15 e 30 min a 20 °C).

Os fatores que poderiam afetar a destruição de micro-organismos pelo ultrassom são: o tempo de contato/exposição, o tipo

de micro-organismo, o volume de produto a ser processado, a composição do mesmo e a temperatura de tratamento (FDA, 2000).

As diferenças na viscosidade dos meios também podem explicar algumas das diferenças, uma vez que há um número mais elevado de sobreviventes de micro-organismos em meios mais viscosos, pois a alta viscosidade protege os micro-organismos, reduzindo a cavitação (SANTOS et al., 2010).

Inativação de bactérias empregando dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂)

A aplicação do uso da técnica de alta pressão de dióxido de carbono (CO₂) em alimentos vem sendo objeto de estudos científicos. O efeito antimicrobiano do uso de supercrítico tem demonstrado maior eficácia em produtos alimentícios líquidos (FERRENTINO et al., 2014), com uma menor quantidade de trabalhos em matrizes sólidas.

O processo a alta pressão consiste em uma tecnologia inovadora de processamento de alimentos com utilização de pressões elevadas, que possui vantagens em relação às tecnologias térmicas convencionais, mantendo as características sensoriais do alimento bem próximas do original e garantindo um alimento seguro do ponto de vista microbiológico, por prolongado período de vida útil.

A Tabela IV apresenta os resultados da contagem de *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis* após tratamento com alta pressão de dióxido de carbono (CO₂).

Os resultados encontrados com a bactéria Gram-positiva (*L. monocytogenes*) e a bactéria Gram-negativa (*S. choleraesuis*) utilizando o método supercrítico, submetidos a uma pressão de 200 bar/min, por 120 minutos a 30°C foram satisfatórios, quando comparados à contagem dos micro-organismos sobreviventes sem tratamento. Considerando

Tabela IV - Contagem dos micro-organismos sobreviventes ao tratamento com alta pressão de dióxido de carbono (CO₂)

	<i>L. monocytogenes</i> (UFC/g)	<i>S. choleraesuis</i> (UFC/g)
Com tratamento	5,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²
Sem tratamento	Incontável	Incontável

a inoculação de 1,0 x 10⁵ UFC/g, observa-se uma redução de aproximadamente 3 Log de UFC/g com o tratamento, redução esta que pode ser promissora quando as contagens bacterianas iniciais, nos produtos a serem tratados, são baixas.

Os efeitos inibitórios do dióxido de carbono supercrítico em bactérias patogênicas de origem alimentar podem ser causados pela indução da ruptura celular explosiva devido a um aumento da pressão interna, modificação das membranas celulares e extração de lipídios da parede celular, inativação de enzimas essenciais para o metabolismo celular ou extração de substâncias intracelulares (SPILIMBERGO; BERTUCCO, 2003).

Conclusão

Na análise em relação ao desempenho dos métodos, é possível observar boa eficiência dos óleos, principalmente do óleo essencial de orégano. Além disso, por se tratar de um produto natural, não deixa resíduos prejudiciais aos alimentos, podendo ser recomendada a sua utilização. O emprego do ultrassom como método de controle microbiano se mostrou ineficiente frente aos dois micro-organismos testados. A aplicação da alta pressão com dióxido de carbono supercrítico foi satisfatória, com redução da carga microbiana após o tratamento, mesmo em matriz sólida (mortadela).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- BETTS, G.D.; WILLIAMS, A.; OAKLEY, R.M. 2014. Ultrasonic Standing Waves: Inactivation of Foodborne Microorganisms Using Power Ultrasound. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 2, p. 659-664, 2014.
- BHAT, R., GOH, K.M. Sonication treatment convalesce the overall quality of hand-pressed strawberry juice. **Food Chemistry**, v. 215, p. 470-476, 2017.
- CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, D.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; PAROUL, N.; ASTOLFI, V.; SERAFINI, L.A. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de

hoshó (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. Linaloorifera fujita). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 378-384, 2010.

CHOUHAN, A.; KAUR, B.P.; RAO, P.S. Effect of high pressure processing and thermal treatment on quality of hilsa (*Tenualosa ilisha*) fillets during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 151-160, 2015.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LAVTA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oils components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

FERRENTINO, G.; CALLIARI, N.; BERTUCCO, A.; SPILIMBERGO, S. Validation of a mathematical model for predicting high pressure carbon dioxide inactivation kinetics of *Escherichia coli* spiked on fresh cut carrot. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 85, p. 17-23, 2014.

FONTANA, R. **Efeitos do ultra-som em alta intensidade na ativação e inativação de esporos bacterianos**. 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro-SP, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies**. Jun. 2000. Disponível em: <www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-us.html>. Acesso em: 25 mar. 2019.

GAIO, I.; SAGGIORATO, A.G.; TREICHEL, H.; CICHOSKI, A.J.; ASTOLFI, V.; CARDOSO, R.I.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; PAROUL, N.; CANSIAN, R.L. Antibacterial activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.) in Italian-type sausage. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 123-129, 2015.

HAMANN, D.; TONKIEL, K.F.; MATTHIENSEN, A.; ZENI, J.; EVALDUGA, E.; PAROUL, N.; STEFFENS, C.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R. Ultrasound use for *Listeria monocytogenes* attached cells removal from industrial brine injection needles. **Italian Journal of Food Science**, v. 30, n. 4 p. 664 – 672, 2018.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

JOSÉ, J.F.B.; VANETTI, M.C.D. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella enterica* Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v. 24, n. 1-2, p. 95-99, 2012.

MARTINS, C.R.F.; FERREIRA, J.A.P.S.; SIQUEIRA, L.F.G.; FERREIRA, L.A.P.; BAZZO, M.L.; FRANCHINI, M.; BERRO, O. J.; VALLE, S. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília: Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 2001.

SANTOS, A., LOURENÇO, D., FERREIRA, S., PITA, N. CABETE, A. **Ondas de ultrassons**. Escola Superior Agrária de Coimbra. Processamento Geral de Alimentos, Portugal, 2010.

SHINAGAWA, F. B.; ROSENTHAL, R. D.; ZARUR, A. M. A. Hydrostatic high pressure in sensory attributes of papaya nectar. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1898-1904, 2013.

SOARES, D.; LERIN, L.A.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.; MAZUTTI, M.A. Inactivation of *Listeria monocytogenes* using supercritical carbon dioxide in a high-pressure variable-volume reactor. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 514-518, 2013.

SPILIMBERGO, S.; BERTUCCO, A. Non-Thermal Bacteria Inactivation with Dense CO₂. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 84, n. 6, p. 627-638, 2003.

SOUSA, L.C.S.; SOUSA, J.S.; BORGES, M.G.B.; MACHADO, A.V.; SILVA, M.J.S.; FERREIRA, R.T.F.V.; SALGADO, A.B. Tecnologia de embalagens e conservação de alimentos quanto aos

aspectos físico, químico e microbiológico. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 8, n. 1, p. 19-27, 2012.

SREY, S.; JAHID, I.K.; DO HÁ, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.

WILLIAMS, J.R.; CLIFFORD, A.A. Introduction to Supercritical Fluids and Their Applications, **Supercritical Fluid Methods and Protocols**, v. 13, p. 1-16, 2000.

YAGIZ, Y.; KRISTINSSON, H.G.; BALABAN, M.O.; WELT, B.A.; RALAT, M.; MARUICE, R.; MARSHALL, M.R. Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 828-835, 2009.

YAP, P.S.X.; YIAP, B.C.; PING, H.C.; LIM, S.H.E. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2014.

