

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LIDIANNE FABRÍCIA DOS SANTOS TOMAIS

REDUÇÃO DE ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS THURINGIENSIS* APÓS TRATAMENTO COM ORTOFTALALDEÍDO POR FUMIGAÇÃO A SECO OU SOLUÇÃO DE AMÔNIA E GLUTARALDEÍDO POR SPRAY

Uberlândia

2023

LIDIANNE FABRÍCIA DOS SANTOS TOMAIS

REDUÇÃO DE ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS THURINGIENSIS* APÓS TRATAMENTO COM ORTOFTALALDEÍDO POR FUMIGAÇÃO A SECO OU SOLUÇÃO DE AMÔNIA E GLUTARALDEÍDO POR SPRAY

Trabalho de Conclusão de Residência
apresentado ao Programa de Residência
Uniprofissional em Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia, como
exigência para a conclusão de Residência
em Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Prof. Dra. Belchiolina Beatriz
Fonseca

Uberlândia

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LIDIANNE FABRÍCIA DOS SANTOS TOMAIS

REDUÇÃO DE ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS THURINGIENSIS* APÓS TRATAMENTO COM ORTOFTALALDEÍDO POR FUMIGAÇÃO A SECO OU SOLUÇÃO DE AMÔNIA E GLUTARALDEÍDO POR SPRAY

Trabalho de Conclusão de Residência
apresentado ao Programa de Residência
Uniprofissional em Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia, como
exigência para a conclusão de Residência
em Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Prof. Dra. Belchiorina Beatriz
Fonseca

Banca examinadora

Profª. Drª. Belchiorina Beatriz Fonseca

Profª. Drª. Anna Monteiro Correia Lima

Dra. Lara Reis Gomes

Uberlândia

2023

REDUÇÃO DE ESPOROS DE *BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS THURINGIENSIS* APÓS TRATAMENTO COM ORTOFTALALDEÍDO POR FUMIGAÇÃO A SECO OU SOLUÇÃO DE AMÔNIA E GLUTARALDEÍDO POR SPRAY

RESUMO

Os esporos de bacilos são usados como indicadores para avaliar a qualidade da desinfecção e esterilização. O formaldeído é um desinfetante altamente eficiente, mas apresenta diversas desvantagens durante seu uso, como forte odor e propriedade cancerígena. O ortoftalaldeído (ORT) e a solução de amônia e glutaraldeído (AG) são alternativas ao formaldeído. O trabalho em questão buscou avaliar a redução dos esporos de *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus thuringiensis* (BT) após tratamento com ORT por fumigação a seco e solução de AG por spray. No teste realizado inicialmente, os esporos BT e BS foram tratados com 500uL/m³ de ORT (que equivale a 22,5mg do produto ativo/ m³) ou AG por aspersão (500ug por gaze) por 20 minutos. No segundo teste, os esporos de BS e BT foram tratados com (2,5mL/ m³ de ORT (que equivale a 112,5mg/m³ do produto ativo) por 40 minutos. Os esporos tratados com ORT (1,405 mg/mL) por 20 minutos por fumigação seca apresentaram 82,01% e 99,09% de inibição nos esporos BS e BT, respectivamente. Quando tratamos os esporos BT e BS por 40 minutos a (~2,5mL/m³) com ORT a redução foi de 93,5% e 100%, respectivamente. Após a realização dos testes, foi feito a concentração bactericida mínima (CBM) de ORT e AG em esporos de BT e BS pelo método de microdiluição em placas. A CBM de AG foi de 15,62mg/mL e 7,81mg/mL nos esporos de BS e BT, respectivamente. A CBM do ORT foi de 11,25mg/mL e 5,62mg/mL nos esporos de BS e BT, respectivamente. Embora o resultado da CBM do AG tenha sido semelhante ao ORT, o ORT foi mais eficiente na inibição de esporos quando simulamos as condições de indicação de uso do campo. Para BT, ORT (~2,5mL/m³ por 40 minutos que equivale a 112,5mg/m³ do produto ativo) apresentou efeito esporicida mostrando a alta eficiência de desinfecção deste desinfetante. O ORT pode ser utilizado em processos de desinfecção em laboratórios ou avicultura em substituição aos desinfetantes já conhecidos. No entanto, devem ser realizados estudos aumentando tempo do ORT ou dose do AG para avaliar o efeito esporicida em BS.

Palavras-chave: biossegurança; desinfetantes; concentração bactericida mínima

REDUCTION OF SPORES OF *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS THURINGIENSIS* AFTER TREATMENT WITH ORTHOPHTHALALDEHYDE BY DRY FUMIGATION OR SOLUTION OF AMMONIA AND GLUTARALDEHYDE BY SPRAY

SUMMARY

Bacillus spores are used as indicators to assess the quality of disinfection and sterilization. Formaldehyde is a highly efficient disinfectant, but it has several disadvantages during its use, such as a strong odor and carcinogenic property. Orthophthalaldehyde (ORT) and ammonia and glutaraldehyde (AG) solution are alternatives to formaldehyde. The work in question sought to evaluate the reduction of spores of *Bacillus subtilis* (BS) and *Bacillus thuringiensis* (BT) after treatment with ORT by dry fumigation and AG solution by spray. In the test performed initially, BT and BS spores were treated with 500uL/m³ of ORT (which is equivalent to 22.5mg of active product/m³) or AG by aspersion (500ug per gauze) for 20 minutes. In the second test, BS and BT spores were treated with (2.5mL/m³ of ORT (which equals 112.5mg/m³ of the active product) for 40 minutes. Spores treated with ORT (1.405 mg/mL) for 20 minutes by dry fumigation showed 82.01% and 99.09% inhibition in BS and BT spores, respectively. When we treated BS and BT spores for 40 minutes at (~2.5mL/m³) with ORT the reduction was 93.5% and 100%, respectively. After carrying out the tests, the minimum bactericidal concentration (MBC) of ORT and AG in spores of BT and BS was performed by the microdilution method in plates. The MBC of AG was 15.62mg/mL and 7.81mg/mL in BS and BT spores, respectively. ORT CBM was 11.25mg/mL and 5.62mg/mL in BS and BT spores, respectively. Although the MIC result of AG was similar compared to ORT, ORT was more efficient in inhibiting spores when we simulated the conditions indicated for use in the field. For BT, ORT (~2.5mL/ for 40 minutes which is equivalent to 112.5mg/m³ of the active product) showed a sporicidal effect showing the high disinfection efficiency of this disinfectant. ORT can be used in disinfection processes in laboratories or aviculture, replacing the already known disinfectants. However, studies must be carried out by increasing the ORT time or AG dose to evaluate the sporicidal effect on BS.

Keywords: biosecurity; disinfectants; minimum bactericidal concentration

INTRODUÇÃO

Em laboratórios, a biossegurança e higiene são características fundamentais. A presença de esporos em materiais e equipamentos pode representar riscos como resultados errôneos ou a necessidade de repetições de testes gerando aumento dos custos e retrabalho.

Segundo Rutala e Weber (2008), a desinfecção é um processo que elimina a maioria ou todos os micro-organismos de uma superfície, exceto esporos bacterianos. Para eliminação de esporos é utilizado o processo de esterilização que é definido como o processo que elimina todos os microrganismos vivos inclusive esporos (Centers for Disease Control and Prevention - CDC). O controle de micro-organismos, especialmente de esporos de bactérias é um desafio, porque podem sobreviver em equipamentos e superfícies até mesmo após uma esterilização realizada de uma forma mal feita.

Alguns agentes químicos têm ação esterilizante. Dentre os principais agentes químicos utilizados para desinfecção e esterilização de equipamentos e superfícies está o formaldeído. Porém, segundo a ANVISA, resolução RDC nº91/2008 (BRASIL, 2008), devido aos efeitos tóxicos e carcinogênicos do formaldeído, outros desinfetantes estão sendo utilizados como substitutos, como glutaraldeído (AG) associado a amônia quaternária (OLIVEIRA, 2010) ou ortoftalaldeído (ORT) (BRASIL, 1988).

O ORT é um dialdeído, considerado um desinfetante de alto nível que tem a capacidade de bloquear o processo de germinação dos esporos. Já o glutaraldeído é um dialdeído saturado usado como desinfetante e esterilizante químico, que possui ação esporicida quando associado a agentes alcalinizantes. Os compostos de amônia quaternária também são utilizados como desinfetantes, tendo ação bactericida de inativação de enzimas produtoras de energia, desnaturação e ruptura de membrana celular (Centers for Disease Control and Prevention - CDC).

Por serem formas altamente resistentes, os esporos de bactérias são amplamente utilizados como indicadores biológicos de esterilização (como espécies dos gêneros *Bacillus* e *Geobacillus* por exemplo). Assim, a capacidade de eliminação de esporos mostra a qualidade da desinfecção ou esterilização (RUTALA, 2008).

Bacillus spp. são bactérias aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas, Gram-positivas, e pertencem a família Bacillaceae que podem ser encontradas sob formas individuais ou em cadeias, em substratos que variam. Suas células possuem o formato de bastonete e as condições para seu crescimento está entre 10 a 45°C, com temperatura ideal de 30°C (BIANCHINI-JÚNIOR, 2021). Em meio a algumas restrições, como a ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária (ALVES,

2018). Além de propriedades probióticas (DE SOUZA, 2014), os esporos de *Bacillus* são usados como padrão para avaliação da desinfecção e esterilização. (RUTALA, 2008)

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia dos desinfetantes à base de ortoftaldeído (ORT) e de amônia quaternária associada a glutaraldeído (AG) sob esporos de *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis* e assim avaliar se esses desinfetantes podem substituir o formol dentro do ambiente de laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC-UFU), Uberlândia, Minas Gerais. Foram utilizadas uma cepa de *Bacillus subtilis* (BS) e uma cepa de *Bacillus thuringiensis* (BT) isoladas do Instituto Oswaldo Cruz mantidas em caldo infusão cérebro coração (BHI) e glicerol a -70°C. Para realizar o crescimento, coletou-se uma alçada de colônias que foram estriadas em meio ágar nutriente (AN) (Biolog) adicionado de 10,25mg/mL de magnésio e 3,07mg/mL de manganês que induz a esporulação das bactérias. As placas foram incubadas por 24 horas a 33°C. Após o crescimento, as colônias foram raspadas com alça bacteriológica e transferidas para um microtubo contendo salina a 0,85% e submetidos a uma temperatura de 90°C por 10 minutos no Termobloco para eliminação das formas vegetativas que pudessem estar presentes. Em seguida, a solução de bactérias foi transferida para um falcon de 15mL contendo PBS em pH ácido (pH 5) para manutenção das formas esporuladas. Após isso, a solução foi titulada.

Os desinfetantes testados foram o ortoftaldeído (ORT) (Ortosell G®) e a solução contendo glutaraldeído a 50% e amônia quaternária a 80% (AG) (AVT-450®), ambos fabricados por PolySell Produtos Bioquímicos Ltda. O teste realizado com o ORT foi feito em cabine de segurança biológica (BioSEG 09), onde os cálculos do produto foram baseados na área de trabalho da cabine considerando a altura em que o fluxo é aberto para passagem do ar ($1,200 \times 0,879 \times 0,623 = 0,657 \text{ m}^3$).

Teste de aplicação dos produtos

Para realização do teste, uma gaze foi embebida com 200 uL de esporos diluídos em salina de cada espécie de bactéria (BS ou BT) e repousada sobre uma placa de petri com uma alça de drigalski estéril impedindo a gaze de encostar na placa. Foram utilizadas 3 gazes para cada esporo de espécie de bactéria (triplicata). Paralelamente três (3) gazes foram mantidas fora do fluxo como controle positivo e três (3) como controle negativo. As gazes foram submetidas a fumigação 500 uL/m^3 (que equivale a 22,5mg do produto ativo/ m^3) de ortoftaldeído por 20 minutos em uma cabine de segurança biológica totalmente fechada, enquanto outras seis gazes (três para o esporo

de cada espécie de bactéria) foram embebidas por borrifadas glutaraldeído (volume total de 1mL do produto diluído sendo 500ug de glutaraldeído por gaze) e mantidas por 20 minutos em outra cabine de segurança biológica. Após esse período, as gazes foram transferidas para um tubo falcon de 50 mL contendo 10 mL de salina e homogeneizada com auxílio de um vórtex por 1 minuto. Foram retirados 100 uL da solução da gaze, transferidos para um microtubo contendo 900 uL de salina, homogeneizado e realizado 7 diluições seriadas na base 10. Após isso as bactérias foram incubadas por 24 horas a 37°C e tituladas em placas de ágar nutriente (AN)

Como houve resultado favorável para o ORT nós realizamos mais um experimento exatamente como o anterior, porém, com um tempo maior (40 minutos) e submetidos a fumigação de 2,5mL do produto/m³ (que equivale a 112,5mg/m³ do produto ativo).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima foi realizada pelo método da microtitulação em placa de 96 poços realizando diluições seriada na base 2 a partir da concentração de 125mg/mL de glutaraldeído para AG e 22,5mg/mL para ORT. Os seguintes grupos foram testados para os esporos de cada espécie de bactéria: (i) Controle positivo (CP) tratado apenas com os esporos de BS ou BT, (ii) inoculados com BS ou BT e tratados com ORT, (iii) inoculados com BS ou BT e tratados com AG e (iv) controle negativo (CN) não inoculado com bactérias ou tratados. Cada diluição para cada grupo e cada espécie de bactéria foi feita em triplicata.

Resumidamente um total de 6log UFC/mL dos esporos de cada espécie foi inoculado em cada pocinho contendo caldo Mueller-Hinton (MH) e os desinfetantes em 5 diferentes diluições na base 2 a partir de 125mg/mL de glutaraldeído para o AG e 22,5mg/mL para o ORT foram inoculados. As placas foram então incubadas por 18-24 horas a 34°C.

Após 18-24 horas do período de incubação, foi realizada a leitura das placas. Devido a reação dos produtos com o meio de cultivo houve a impossibilidade interpretação dos resultados para o CIM. Assim, foi necessário realizar o cálculo da concentração bactericida mínima (CBM). Para a realização da concentração bactericida mínima cada diluição realizada no CIM foi inoculada em ágar AN e incubada a 34°C por 24-36 horas. A CBM correspondeu a concentração onde não houve crescimento bacteriano.

Também foi realizada a contagem de bactérias na menor concentração testada para o cálculo da percentagem de inibição na menor concentração. Para isso, na menor concentração (2,81mg/mL para o ORT e 7,81mg/mL para glutaraldeído) foi realizada a diluição seriada na base 10 para contagem em ágar nutriente.

Análise estatística

Para análise estatística quando avaliou a eficiência do ORT ou AG sobre esporos de BS e BT por 20 minutos, os dados foram avaliados pela ANOVA seguida do test de Tukey. Quando a avaliação foi apenas referente a atividade do ORT por 40 minutos para o controle de BT e BS foi realizado o teste t considerando um $p < 0,05\%$ usando o programa Graph Pad Prism 9.01. A análise da redução dos esporos só foi realizada para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de AG por pulverização na diluição indicada pelo fabricante (1:1000 que corresponde 500ug/mL de glutaraldeído ativo) não reduziu os esporos de BS ou BT (Figura 1A, 1C). Entretanto, os esporos tratados com ORT ($\sim 22,5\text{mg/m}^3$) por 20 minutos por fumigação seca apresentaram 82,01% e 99,09% de inibição nos esporos BS e BT respectivamente (Figura 1A, 1C, Tabela 1). Quando tratamos os esporos BS e BT por 40 minutos a ($\sim 112,5\text{mg/m}^3$) com ORT a redução foi de 93,5% e 100% (Figura 1B, 1D, Tabela 1).

Figura 1. Quantificação de esporos de *Bacillus subtilis* (BS) ou *B. thuringiensis* (BT) após tratamento com ortoftalaldeído (ORT) por fumigação seca ou solução de amônia e glutaraldeído (AG) por spray.

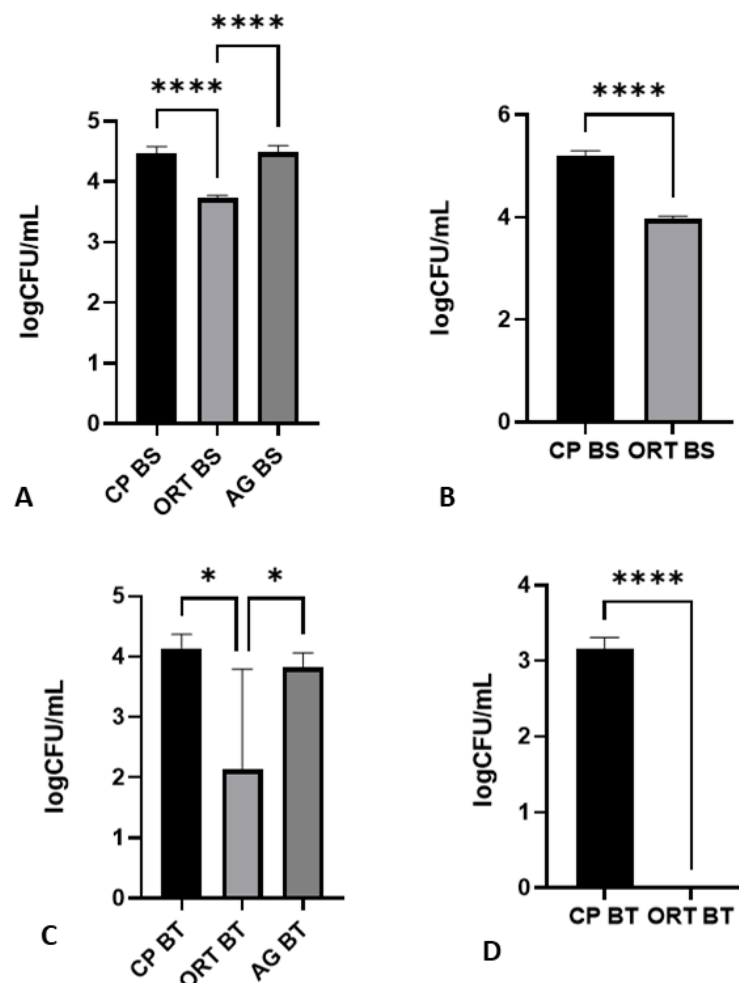


Figura 1. A: Quantidade BS no controle positivo (CP) ou tratadas com ORT (22,5mg/m³ do produto ativo) por fumigação seca ou solução AG (500mg/mL do produto ativo) durante 20 min. B: Quantidade de BS tratados com ORT (112,5mg/m³ do produto ativo) por 40 minutos. C: Quantidade de BT tratados de forma similar a A. D: Quantidade de BT tratados de forma semelhante a B. A temperatura no difusor usado pra gerar a fumigação seca no ORT chegou a 76°C aos 20 minutos e 86,6°C aos 40 minutos. Foi realizada ANOVA seguida pelo teste de Tukey para A e C, para B e D foi realizado o teste t com 5% de significância.

A dose inicial de BT 20 e 40 min: 4,17 e 3,16 log UFC/mL, respectivamente. Quando se utilizou o inóculo inicial de 3,16 log UFC/ml de BT a bactéria não foi isolada após o tratamento com ORT por 40 minutos. Então, para essa dose inicial o desinfetante apresentou efeito de inibição de 100% sendo o ortoftalaldeído esporicida para BT.

A dose inicial pra BS 20 e 40 min: 4,47 e 5,21 log UFC/mL respectivamente. A quantidade de esporos não é padronizada porque depende da eficiência do processo de esporulação.

Tabela 1. Inibição de esporos de *Bacillus subtilis* ou *B. thuringiensis* tratados com ORT em diferentes doses e tempo

	Redução em log UFC/mL	% de Inibição
BS 20 min (1mL/m ³)	0,74	82,01
BT 20 min (1mL/m ³)	2,04	99,09
BS 40 min (4mL/m ³)	1,21	93,50
BT 40 min (4mL/m ³)	3,16	100*

BS: *Bacillus subtilis*; BT: *B. thuringiensis*; min: minutos. A temperatura no difusor chegou a 76,0°C aos 20 minutos e 86,60°C aos 40 minutos.

Sabe-se que o BS e BT, quando submetidos a um ambiente com escassez de nutrientes, produzem células distintas chamadas esporos. Esses esporos com uma alta resistência, podem sobreviver a temperaturas extremas, exposição a produtos químicos, dessecação, além de outras condições de adversidade (WANG; WANG; YANG, 2017; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). Os esporos são resistentes à desinfecção e outros métodos de inativação comparado com as células vegetativas (YOUNG; SETLOW, 2003). Entretanto, baseado nos resultados positivos com redução dos esporos tratados com ORT (Tabela 1), pode-se afirmar a eficiência da desinfecção com o produto citado com efeito esporicida para o BT.

Para o BS a redução ocorreu, porém, sem um efeito esporicida. Há de se considerar um fator importante relacionado a inibição do BS. A dose inicial foi maior que o BT e isso pode ter interferido nos resultados. Mas, possivelmente mesmo com uma dose menor o efeito esporicida não ocorreria visto que a redução encontrada foi de apenas 1,21 log UFC/mL. Esporos de BS são padrões para avaliar o efeito de uma boa esterilização. No laboratório tais esporos podem contaminar ambiente, equipamentos, materiais e outras cepas bacterianas levando a resultados falsos ou retrabalho. Assim, um efeito esporicida é altamente desejável. Em trabalhos futuros pretende-se aumentar o tempo de desinfecção para avaliar se o ORT apresenta um efeito esporicida sobre esporos de BS.

Após a utilização dos desinfetantes em doses indicadas pelo fabricante, foi realizado o cálculo da CBM e da CIM. Como não foi possível chegar na dose da CIM foi feito a CBM sendo possível verificar o efeito bactericida dos desinfetantes.

A CBM do ORT foi de 11,25mg/mL e 5,62mg/mL nos esporos de BS e BT, respectivamente. A CBM de AG foi de 15,62 e 7,81 mg/mL (dose correspondente ao glutaraldeído na solução) nos esporos de BS e BT, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Valor da CBM (concentração bactericida mínima) do glutaraldeído na solução de AG e do ORT sobre esporos de *Bacillus subtilis* (BS) e *Bacillus thuringiensis* (BT)

	BS	BT
ORT	11,25 mg/mL	5,62 mg/mL
AG	15,62 mg/mL	7,81mg/mL

ORT: Ortoftalaldeído. AG: solução de amônia e Glutaraldeído. O valor indicado na tabela corresponde a dose do glutaraldeído na solução de AG. BS: *Bacillus subtilis*. BT: *Bacillus thuringiensis*

A utilização de AG no teste de aspersão foi feita de acordo com a diluição indicada pelo fabricante (1:1000, que corresponde a 500ug/mL do glutaraldeído ativo no produto), onde não reduziu os esporos de BS e BT. Feito a CBM, podemos observar que a menor concentração testada (7,81 mg/mL para BT e 15,62 mg/mL para BS) foi capaz de reduzir de forma eficaz os esporos de BT e BS (Tabela 3). Para avaliar se há um resultado esporicida eficaz com AG, sugere-se utilizar uma concentração maior que a indicada pelo fabricante, de acordo com o presente experimento.

Ambos os desinfetantes apresentaram redução média (média da triplicata) maior que 90% para as duas espécies de *Bacillus* (Tabela 3) quando avaliamos a redução na menor dose testada (1,405 mg/mL para o ORT e 7,81mg/mL para o glutaraldeído), demonstrando assim sua eficiência quando utilizados nas concentrações descritas anteriormente.

Tabela 3. Média de redução de esporos de *B. subtilis* e *B. thuringiensis* pelo ORT e AG na menor concentração testada (5,62 mg/mL e 7,81 mg/mL)

	ORT	AG
<i>B. subtilis</i>	92,86 %	94,5 %
<i>B. thuringiensis</i>	99,99 %	100,00 %

ORT: Ortoftalaldeído. AG: Amônia quaternária associada a glutaraldeído.

Com o intuito de um efeito esporicida, os desinfetantes devem ser utilizados em concentrações e/ou tempos maiores que as descritas no presente estudo.

CONCLUSÃO

O ORT pode ser utilizado em processos de desinfecção em laboratórios ou indústria em substituição aos desinfetantes já conhecidos. Outros testes devem ser realizados para testar doses maiores da associação entre amônia quaternária e glutaraldeído do que as utilizadas neste trabalho. O ORT deve ser testado para esporos de BT com tempo maior que o utilizado nesse trabalho em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

Bianchini Júnior, José Carlos. "Efeito do extrato hexânico de *Ricinus communis* L. sobre esporos de *Bacillus thuringiensis*". Trabalho de conclusão de curso, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021. <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/30943>.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares*. Portaria 15. Aprovado em 5 de setembro de 1988.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Proíbe o uso isolado de produtos que contenham paraformaldeído ou formaldeído, para desinfecção e esterilização, regulamenta o uso de produtos que contenham tais substâncias em equipamentos de esterilização e dá outras providências*., Resolução 91, aprovado em 28 de novembro de 2008.

Caroline Souza Alves, Kessia, Maria Edilene Martins de Almeida, Juliane Correa Glória, Felipe Araújo dos Santos, Keila Dayane Pereira, Diogo Pereira de Castro e Luis André Moraes Mariúba. "Bacillus subtilis: uma versátil ferramenta biotecnológica". *Scientia Amazonia* 7, n.º 2 (2018): 15–23.

Centers for Disease Control (CDC). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. 2008.

De Souza, Renata Damásio, Milene Tavares Batista, Wilson Barros Luiz, Rafael Ciro Marques Cavalcante, Jaime Henrique Amorim, Raíza Sales Pereira Bizerra, Eduardo Gimenes Martins e Luís Carlos de Souza Ferreira. "Bacillus subtilis Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action". *PLoS ONE* 9, n.º 1 (27 de janeiro de 2014): e87454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087454>.

Glare, Travis R., e Maureen O'Callaghan. *Bacillus thuringiensis: Biology, ecology and safety*. Chichester: Wiley, 2000.

Oliveira, Maria Beatriz Siqueira Campos de, e Joseli Maria da Rocha Nogueira. "Conceitos e técnicas básicas aplicadas em laboratório". In *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*, 67–123. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010.

Rutala, William A., e David J. Weber. "FDA Labeling Requirements for Disinfection of Endoscopes: A Counterpoint". *Infection Control and Hospital Epidemiology* 16, n.º 4 (abril de 1995): 231–35. <https://doi.org/10.2307/30140983>.

Wang, He, Yunxiang Wang e Ruijin Yang. "Recent progress in Bacillus subtilis spore-surface display: concept, progress, and future". *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, n.º 3 (6 de janeiro de 2017): 933–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8080-9>.

Young, S. B., e P. Setlow. "Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide". *Journal of Applied Microbiology* 95, n.º 1 (julho de 2003): 54–67. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01960.x>.