

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



RICARDO DURÃES DE CARVALHO

“Efeito da Alta Pressão Hidrostática em *Aeromonas hydrophila* AH

191 crescida em leite e em meio de cultura”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ricardo Durães de Carvalho
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé
Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to the advisor or co-advisor.

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Carvalho, Ricardo Durães

C253e Efeito da alta pressão hidrostática em *Aeromonas hydrophila* AH 191 crescida em leite e em meio de cultura / Ricardo Durães Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 20 10.

Orientadores: Carlos Francisco Sampaio Bonafé,
Cláudio Chrysostomo Werneck.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Aeromonas hydrophila*. 2. Inativação bacteriana.
3. Alta pressão hidrostática. 4. Toxinas. I. Bonafé,
Carlos Francisco Sampaio. II. Werneck, Cláudio
Chrysostomo. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effect of high hydrostatic pressure in *Aeromonas hydrophila* AH 191 grown in milk and culture medium.

Palavras-chave em inglês: *Aeromonas hydrophila*; Bacterial inactivation; High hydrostatic pressure.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Carlos Francisco Sampaio Bonafé, Marcelo Lancellotti, Fabiana Fantinati-Garboggini.

Data da defesa: 10/12/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 10 de dezembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé (Orientador)



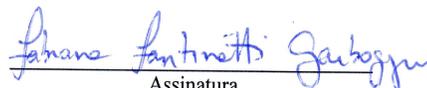
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti



Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinati-Garboggini



Assinatura

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Roberto Nóbrega Amorim

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus;

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, pela oportunidade oferecida para que este trabalho de pesquisa fosse desenvolvido e, sobretudo, pelo incentivo dado nestes importantes passos de minha formação;

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano por ter cedido seu laboratório para a realização dos experimentos, em especial, ao seu corpo técnico que por várias vezes ajudou com os experimentos;

Ao Prof. Dr. Paulo P. Joazeiro, Juvani Lago Saturno e ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP Adriane Cristina Sarti Sprogis e Antonia Maria Ferreira Lima por toda ajuda na preparação das amostras para a realização das análises;

A Luciano Moura Martins, e Robert Bernedo Navarro por sempre estarem me ajudando com novas idéias e novas metodologias para o meu trabalho;

Ao pessoal do laboratório de Termodinâmica de Proteínas (Joelma Vieira, Juliana Mattoso, Douglas Ricardo);

Aos docentes, funcionários e alunos de Pós Graduação dos Departamentos de Bioquímica e de Microbiologia e Imunologia deste Instituto por toda ajuda;

Aos amigos e familiares Gibran Durães, Bruno Durães, Henrique Oliveira, Josué Neto Durães, Jarbas Sudré, Thiago Durães, José Carlos Durães, Bruno Sodré, Leonardo Tomaselli, Josué Durães Filho, Márcio Oliveira e, também, aos amigos da moradia estudantil da UNICAMP (Raul Souza de Oliveira, Thiago Leonel, Vagner Oliveira, Diomário Cerqueira, Ancelmo Rabelo, Alisson Dropa) pelos momentos de força e descontração;

À minha mãe Josélia Maria Durães e aos irmãos Diana Durães, Guilherme Durães por sempre me apoiarem nos meus objetivos;

Especialmente meus agradecimentos a Juliana Sodré de Oliveira pelo carinho e por continuamente incentivar meu crescimento;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro;

A todos não citados que de forma direta ou indireta contribuíram, não somente para este trabalho como também para o meu crescimento pessoal.

Obrigado a todos.

“A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.”

(Albert Einstein)

ÍNDICE

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Geral.....	9
2.2 Específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Bactérias.....	10
3.2 Ensaaios para a detecção do gene <i>aer</i> em espécies de <i>Aeromonas spp.</i> pela técnica da PCR.....	10
3.2.1 Preparação das amostras bacterianas para a PCR.....	10
3.2.2 Primers utilizados.....	11
3.2.3 Protocolo da PCR.....	11
3.3 Tratamento com alta pressão.....	11
3.3.1 Sistema de alta pressão.....	11
3.3.2 Preparo da cepa <i>A. hydrophila</i> AH 191 para realização de testes de viabilidade celular.....	13
3.3.3 Efeitos dos tempos de tratamento em APH e determinação da viabilidade bacteriana de <i>A. hydrophila</i> AH 191 em PBS e leite UHT.....	14
3.3.3.1 Aplicação do choque de alta pressão em <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	14
3.4 Preparação do leite contaminado com <i>Aeromonas hydrophila</i> AH 191.....	15

3.5 Determinação dos títulos de toxicidade de <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	16
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	16
3.6.1 Preparação das amostras.....	16
3.7 Ensaio biológicos.....	17
3.7.1 Preparo das culturas celulares.....	17
3.7.1.2 Ensaio de atividade citotóxica sobre culturas de células Vero e CaCo2.....	18
3.7.2 Ensaio para a detecção da atividade hemolítica.....	18
3.7.3 Estudo da enteropatogenicidade.....	19
3.7.3.1 Teste em camundongo recém-nascido (CRN).....	19
4. RESULTADOS.....	20
4.1 Teste para amplificação do gene da aerolisina.....	20
4.2 Tratamento com Alta Pressão Hidrostática e curva de sobrevivência bacteriana.....	21
4.2.1 Tratamento com o choque de alta pressão sobre a viabilidade de <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	22
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	24
4.4 Efeito da APH em toxinas de <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	25
5. DISCUSSÃO.....	33
6. CONCLUSÕES.....	40
7. PERSPECTIVAS.....	41
8. REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS.....	56

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Alterações estruturais e funcionais nos micro-organismos em diferentes pressões.....	6
Figura 2. Componentes do sistema de alta pressão hidrostática.....	13
Figura 3. Ocorrência e distribuição do fragmento de amplificação do gene <i>aer</i> de <i>Aeromonas spp</i>	20
Figura 4. Curva de sobrevivência de <i>A. hydrophila</i> AH 191 em função do tempo de tratamento em 250 MPa (PBS 0,1 M, pH 7,4, T = 25 °C) e em leite UTH.....	21
Figura 5. Efeito do choque de alta pressão hidrostática na cepa <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	23
Figura 6. Microscopia Eletrônica de Varredura da cepa <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	24
Figura 7. Determinação da atividade citotóxica de <i>A. hydrophila</i> cultivada em meio TSB e em leite, submetidas à APH e aplicadas em culturas de células Vero.....	26
Figura 8. Ensaio com leite contaminado com <i>Aeromonas</i> crescida em diferentes tempos.....	27
Figura 9. Tratamento da Alta Pressão Hidrostática na atividade biológica das toxinas presente no sobrenadante de cultura bacteriana.....	29
Figura 10. Microscopia óptica de células Vero exposta ao sobrenadante de cultura de <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	30

Figura 11. Microscopia óptica de células Vero expostas ao leite contaminado com <i>A. hydrophila</i> AH 191 crescida em diferentes tempos.....	31
Figura 12. Microscopia óptica de células CaCo2 expostas ao leite contaminado com <i>A. hydrophila</i> AH 191.....	32
Tabela 1. Inativação bacteriana induzida por alta pressão hidrostática em leite.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>aer</i>	aerolisina
AH	<i>Aeromonas hydrophila</i>
AS	<i>Aeromonas sobria</i>
APH	alta pressão hidrostática
ATV	associação tripsina-versene
CHO	ovário de hamster chinês
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
kDa	kiloDalton
MEM	meio mínimo de Eagle
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MPa	megaPascal
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia pela polimerase
SFB	soro fetal bovino
TSA	ágar trípticase de soja
TSB	caldo trípticase de soja
UFC	unidade formadora de colônia
UHT	tratamento com alta temperatura
UV	ultravioleta

RESUMO

A exposição à alta pressão é um método eficiente na inativação bacteriana, o qual é importante para a esterilização de alimentos. Neste trabalho, examinamos a inativação por alta pressão hidrostática em *Aeromonas hydrophila* AH 191, produtora de aerolisina, a qual possui atividades citotóxica, enterotóxica e hemolítica. Trinta min a 250 MPa (25 °C em PBS 0,1 M, pH 7,4), resultou em 9 log de UFC/mL de inativação bacteriana (a partir de 10^9 UFC/mL para <10 UFC/mL), porém, os tratamentos não alteraram a atividade hemolítica, enterotóxica e citotóxica produzidas por *A. hydrophila* AH 191. O sobrenadante de cultura bacteriana e o leite contaminado por *A. hydrophila* AH 191, pressurizado ou não, foram aplicados sobre células Vero e CaCo2, suspensões de hemácias humanas e de carneiro, e injetadas por via oral gástrica em camundongos *Swiss*, reproduzindo o ensaio de Dean. Os resultados mostram que os títulos das toxinas em amostras pressurizadas permaneceram iguais aos do controle, assim como as toxinas presentes nos sobrenadantes de cultura e no leite foram capazes de produzir acúmulo de líquidos no intestino de camundongos recém-nascidos. Estes resultados indicam a relevância do estudo na inativação de bactérias para a segurança alimentar e realça a importância de cautela no uso de alta pressão para a esterilização de alimentos, pois embora as bactérias possam ser inativadas, as toxinas produzidas por este micro-organismos podem continuar ativas, representando uma ameaça à saúde humana.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila* AH 191, inativação bacteriana, alta pressão, toxinas.

ABSTRACT

Exposure to high pressure is an efficient method for bacterial inactivation, which is important for the food sterilization. We examine the inactivation by high hydrostatic pressure in *A. hydrophila* AH 191, producer of aerolysin, which has cytotoxic, enterotoxic and hemolytic activities. A 30 min treatment at 250 MPa (25 °C in 0.1 M PBS, pH 7,4) resulted in 9 log CFU/mL of bacteria inactivation (from 10⁹ CFU/mL to <10 CFU/mL). However, the treatment did not inactivate the hemolytic, enterotoxic and cytotoxic activities produced by *A. hydrophila* AH 191. The supernatant of bacterial culture and milk contaminated with *A. hydrophila* AH 191 pressurized or not were applied to Vero and CaCo2 cells, suspensions of human and sheep erythrocytes, and injected into mice via oral gastric *Swiss* reproducing the Dean test. The results show that evidence of toxins in samples pressurized remained similar to that of control, and the toxins in culture supernatants and milk were able to produce fluid accumulation in the intestine of suckling mouse. These results indicate the relevance of the study for bacteria inactivation to food security and enhance the importance for caution in the use of high pressure in foods sterilization, since although the bacteria can be inactivated, the toxins produced by micro-organisms continue to be active, representing a human health threat.

Keywords: *Aeromonas hydrophila* AH 191, bacterial inactivation, high pressure, toxins

1. INTRODUÇÃO

Aeromonas são bacilos Gram-negativos, pertencentes à família *Aeromonadaceae*, não formadores de esporos, produtores de oxidase e catalase, além de fermentarem glicose como carboidrato. Estas bactérias são comumente encontradas no solo, água doce e salgada, sendo as infecções humanas por espécies de *Aeromonas* frequentemente associadas com a ingestão de água e alimentos contaminados. *Aeromonas* tem grande importância como patógenos humanos emergentes. Dados da literatura relatam significativos aumentos do número de infecções em feridas, septicemia e doenças diarreicas provocadas por espécies deste gênero bacteriano nos últimos anos em todo o mundo (Ormen *et al.*, 2003; Bari *et al.*, 2007; Gascun *et al.*, 2007).

Atualmente, existem 22 fenoespécies e 18 genoespécies no gênero *Aeromonas* e pelo menos 9 delas têm sido implicadas em doenças humanas, sendo *A. caviae* (HG-4), *A. veronii* (HG-8), *A. jandaei* (HG-9), *A. schubertii* (HG-12), *A. trota* (HG-14) e *A. hydrophila*, sendo a última a mais frequentemente associada com espécimes clínicos (Lai *et al.*, 2007; Bari *et al.*, 2007).

A. hydrophila é um patógeno que causa uma variedade de doenças como meningite, osteomielite, infecções oculares, sendo a gastroenterite a mais comumente associada à sua infecção (Alcaide *et al.*, 2010). Esta bactéria tem sido isolada de uma variedade de alimentos como legumes, carnes e produtos lácteos, particularmente em alimentos refrigerados, devido a sua capacidade de crescer a baixas temperaturas, e com isso, podem produzir toxinas, o que torna alto o risco de toxi-infecções alimentares (Padilha *et al.*, 2001; Papageorgiou, 2003; Pianetti *et al.*, 2008; Peñas *et al.*, 2010).

Aeromonas também é encontrado em alimentos embalados a vácuo, o que implica em maior probabilidade de infecção por esta bactéria. São sensíveis ao calor e geralmente mortas pelo processo de pasteurização, embora algumas espécies móveis possam ocorrer em leite pasteurizado, queijos brancos brasileiros e outros queijos produzidos a partir de leite pasteurizado, presumivelmente como resultado de uma contaminação pós-pasteurização (Haburchak, 1996; Altwegg, 1999; Smelt, 1998; Trower *et al.*, 2000; Padilha *et al.*, 2001; Fadl *et al.*, 2007; Arcuri *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009).

A produção de toxinas (citotoxinas, endotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, proteases, sideróforos, e fatores de aderência) por *A. hydrophila* exerce papéis importantes na complexa patogênese desta bactéria, sendo que cada uma possui atividades biológicas específicas (Yang *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2005; Cornelis, 2006; Sierra *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2008; Carvalho-Castro *et al.*, 2010).

Das enterotoxinas, duas categorias têm sido descritas: a enterotoxina citotônica e enterotoxina citotóxica. A enterotoxina citotônica, similar à toxina colérica, tem a capacidade de induzir a formação de esteróides e provocar arredondamento em células Y-1 (células adrenocorticais) sem causar alterações no epitélio intestinal (Chopra & Houston, 1999). A enterotoxina citotóxica (Ent-ctx), também conhecida como aerolisina ou β -hemolisina (Fadl *et al.*, 2007) é um dos principais fatores de virulência de *A. hydrophila*, sendo considerada como um potente indicador de patogenicidade, e sua ação está diretamente relacionada a danos no tecido hospedeiro e em alterações gastrointestinais, sendo necessário ensaios moleculares para a sua detecção (Freitas *et al.*, 1993).

A enterotoxina citotóxica, cuja massa molecular varia entre 48 e 54 kDa, expressa múltiplas atividades biológicas, tais como hemólise, enterotoxicidade e citotoxicidade, podendo ser letal quando injetada via intravenosa em camundongos (Ormen *et al.*, 2003;

Fadl *et al.*, 2007). Devido à sua presença em amostras clínicas associadas aos quadros de diarreia provocados por *A. hydrophila*, e principalmente, a presença da toxina nos alimentos contaminados por esta bactéria, fez com que a mesma tenha sido alvo constante de estudos de caracterização biológica e molecular (Hirono *et al.*, 1992; Arcuri *et al.*, 2008).

Atualmente, vários métodos têm sido utilizados para esterilizar alimentos, e os que empregam calor ou produtos químicos para a eliminação de micro-organismos e toxinas, podem alterar as características nutricionais e gustativas dos alimentos (Foberg-Broczek *et al.*, 2005). Por exemplo, a Alta Pressão Hidrostática (APH) a temperaturas moderadas pode ser uma alternativa valiosa para a pasteurização, pois minimiza a contaminação microbiana do leite, melhorando a sua qualidade e aumentando a sua vida de prateleira.

O uso de APH, por não utilizar altas temperaturas, tem gerado grande interesse pela eficácia na inativação dos micro-organismos, sendo que, em certos casos, a técnica apresenta capacidade para descontaminação comparável aos métodos térmicos como a pasteurização. Além disso, o uso da APH prorroga o prazo de validade dos alimentos, e satisfaz a demanda dos consumidores por produtos frescos e alimentos minimamente processados, tendo a capacidade de manter as características organolépticas e as propriedades nutricionais do produto original (Castellví *et al.*, 2005; Goodridge, Willford & Kalchayanand, 2006; Buzrul *et al.*, 2007).

A técnica de APH se baseia no princípio de Le Chatelier e no princípio isostático. No princípio de Le Chatelier (aplicável para transição de fase, mudança de conformação molecular ou reação química), quando um sistema de fase líquida é acompanhado por uma redução de volume, essa redução é favorecida pelo aumento de pressão desde que a temperatura permaneça constante, ou seja, um sistema de volume arbitrário, submetido a

um aumento isotérmico de pressão, terá seu equilíbrio deslocado no sentido de um menor volume total final. O princípio isostático é relacionado ao fato que a pressão é transmitida de uma forma uniforme e quase instantânea através da amostra. O processo de pressurização é, portanto, independente do volume e da forma da amostra, ao contrário do processo térmico (Campos, 2003).

O uso da APH teve como pioneiro Bert H. Hite, que aplicou pela primeira vez há um século, aumentando a qualidade microbiológica do leite, embora a natureza fundamental da tecnologia de pressão nesta época fosse precária. Cerca de vinte anos atrás, no entanto, o Japão já utilizava o processo de APH em uma grande variedade de alimentos para fins comerciais com relativo sucesso, como sucos de frutas, bolo de arroz, peixe, dentre um número cada vez mais crescente de outros alimentos. Desde então, a APH tem sido aplicada de várias formas na indústria alimentícia (Cheftel, 1991; Opkala, Piggott & Schaschke, 2010).

Neste processo de APH, alimentos líquidos ou sólidos são submetidos a pressões acima de 100 MPa. Em sistemas comerciais, as pressões utilizadas enquadram-se na faixa de 400 a 700 MPa. Na pressurização, realizada em espaço confinado, emprega-se um fluido que atua como meio de transferência da pressão. A pressão aplicada e o tempo de aplicação dependem do tipo do produto a ser tratado e do produto final desejado (Torrenzan, 2006).

Na União Européia, a tecnologia de APH está em fase de regulamentação, e nos EUA, a legislação incluiu alimentos esterilizados por APH como uma categoria denominada “novos alimentos” (Spilimbergo *et al.*, 2002; Foberg-Broczek *et al.*, 2005). A partir do desenvolvimento tecnológico, a perspectiva é de que os custos deste processo se tornem cada vez mais acessíveis, possibilitando no mercado o surgimento de maior número de produtos submetidos a este tratamento (Smelt, 1998).

Nos vegetais de diversas variedades, a APH (600 MPa) não induz a perda de substâncias benéficas, sobretudo nos vegetais matriciais (Hugas, Garriga & Monfort, 2002). Sob pressão constante, o tempo de processamento por APH não causa mudanças significativas no volume e no tamanho das partículas de produtos em forma de pó submetidos a esse tratamento (Butz *et al.*, 2002).

Sabe-se também que a APH é capaz de inativar muitos micro-organismos, sendo que para uma total inativação diferentes fatores tem de ser levado em consideração, como a espécie, a sua fase de crescimento, a forma (vegetativa ou esporos), a constituição do meio e o pH (Spilimbergo *et al.*, 2002; Fonberg-Broczek *et al.*, 2005). Muitas vezes é necessário tratamento com APH em tempos de exposição mais prolongados, em combinação com outras condições, como temperaturas mais altas ou baixas para o aumento da eficiência da inativação. A APH pode inativar enzimas-chave da multiplicação dos micro-organismos, inibir a síntese protéica, interferir na troca de íons, na morfologia da célula e nos ribossomos, na replicação do DNA, entre outras (Abe *et al.*, 1999; Hugas *et al.*, 2002), como pode ser observado a seguir na figura 1:



Figura 1. Alterações estruturais e funcionais nos micro-organismos em diferentes pressões. Figura adaptada de Lado & Yousef (2002).

Dentre os micro-organismos, os vírus e as bactérias são susceptíveis à inativação por APH (Spilimbergo *et al.*, 2002; Moerman, 2005). Estudo de Cléry-Barraud *et al.* (2004) mostrou que esporos de *Bacillus anthracis* são inativados por combinação de APH e alta temperatura (500 MPa a 75 °C por 4 min.). Estes resultados são bastante relevantes, considerando que esporos são extremamente resistentes ao tratamento térmico, irradiação, dessecação e desinfetantes.

Por outro lado, a APH também pode induzir mudanças conformacionais significativas sobre as proteínas, estando diretamente relacionada a sua funcionalidade (Kajiyama *et al.*, 1995). Este desdobramento da proteína sob alta pressão ocorre principalmente devido ao rompimento de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, sendo que as ligações covalentes e pontes de hidrogênio, geralmente, não são afetadas (Needs *et al.*, 2000; Bouaouina *et al.*, 2006). Isto significa que a pressão é capaz de romper as ligações que mantêm as estruturas terciárias e quaternárias das proteínas globulares, porém, possui

pouca influência na estrutura primária e secundária, como também em diversas proteínas não globulares e nas vitaminas presentes nos alimentos (Bouaouina *et al.*, 2006).

A APH pode solidificar lipídeos, alterar biomembranas e também afetar a gelatinização do amido. Assim, embora a alta pressão seja conhecida comercialmente como uma técnica de preservação, a mesma tem enorme potencialidade como ferramenta de modificação da textura dos alimentos (Butz *et al.*, 2002).

Outra aplicação potencial da APH é em queijos. Estes precisam ser maturados por meses, em alguns casos anos, antes que eles estejam prontos para venda. Existe evidência que o processamento por APH possa acelerar tal maturação (Trujillo *et al.*, 2002). Entretanto, o processo é complexo, envolvendo enzimas de culturas de bactérias selecionadas a coalho, e os efeitos precisos da pressão nestas ainda não são conhecidos, embora alguns trabalhos nesta área recentemente serem realizados (Trujillo *et al.*, 2002).

Na literatura, são descritos tratamentos com APH em produtos laticínios, tais como o leite, iogurte e queijo cottage. A maioria das proteínas do leite é caseína, que ocorre em grandes agregados supramoleculares chamados micelas, as quais são grandes o bastante para dispersar, dando a aparência opaca familiar do leite. Contudo, o tratamento com alta pressão fragmenta as micelas, conseqüentemente produtos de leite tratados apresentam aumento na rigidez, força e resistência para separação do soro (Drake *et al.*, 1997; Grant, Petterson, & Letdward, 2000; Trujillo *et al.*, 2002).

É notório que existe um interesse crescente no uso da APH para esterilizar leite e produtos relacionados, a fim de evitar a contaminação bacteriana que pode produzir alterações indesejáveis no sabor e diminuir o valor nutricional do produto (López-Fandiño

et al., 1996; Bozoglu *et al.*, 2004). De fato, inúmeros estudos examinaram a eficácia da APH na inativação de micro-organismos naturalmente presentes no leite ou introduzidos artificialmente em testes (Styles *et al.*, 1991; López-Fandiño *et al.*, 1996; Bozoglu *et al.*, 2004; Castellví, 2005), porém, não foram observados na literatura estudos com o efeito da APH associados a inativação de *A. hydrophila* no leite e na eliminação da atividade biológica de suas toxinas. Contudo, um dos focos deste trabalho foi a verificação da ação da APH na atividade biológica das toxinas de *A. hydrophila* AH 191.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da Alta Pressão Hidrostática (APH) na viabilidade de *A. hydrophila* AH 191 e de suas toxinas presentes no leite e no sobrenadante de cultura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos específicos deste trabalho foram, portanto:

1. Verificar o efeito da APH sobre *A. hydrophila* AH 191 em PBS e no leite UHT contaminado por este patógeno usando uma pressão de 250 MPa (pressão máxima suportada pela câmara), pH 7,4, 25 °C;
2. Determinar a viabilidade bacteriana após os tratamentos com pressão de 250 MPa;
3. Realizar Microscopia Eletrônica de Varredura para observar eventuais alterações na parede celular bacteriana pós pressão;
4. Aplicar a APH em diferentes temperaturas nas toxinas produzidas por *A. hydrophila* AH 191.
5. Avaliar o efeito da APH nas toxinas produzidas por *A. hydrophila* AH 191 através de ensaios biológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Bactérias

Os tratamentos de alta pressão foram realizados com a cepa *A. hydrophila* AH 191, produtora de aerolisina que é uma toxina que possui atividades citotóxica, hemolítica e enterotóxica (Fálcon *et al.*, 2003). Esta espécie foi proveniente de isolado clínico pertencente à coleção de bactérias do Laboratório de Fatores de Virulência do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, UNICAMP. Para os ensaios biológicos, incluindo a atividade citotóxica, enterotóxica e hemolítica da aerolisina, *A. sobria* AS 41 e *A. sobria* AS 69 foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente (Martins *et al.*, 2007).

3.2 Ensaios para a detecção do gene *aer* em espécies de *Aeromonas spp.* pela técnica da PCR

3.2.1 Preparação das amostras bacterianas para a PCR

As colônias das cepas *A. hydrophila* AH 191, *A. sobria* 69 e *A. sobria* 41, foram suspensas em *ependorfs* contendo 100 µL de água Milli-Q esterilizada. Em seguida, as suspensões foram aquecidas a 96 °C – 100 °C por 5 min e posteriormente centrifugadas por 2 min (3000 x g). As amostras foram usadas imediatamente após a obtenção do extrato do DNA.

3.2.2 Primers utilizados

Os oligonucleotídeos utilizados, específicos para aerolisina na amplificação do gene *aer* (Invitrogen), foram: *aer1* 5' CCAAGGGGTCTGTGGCGACA 3' e *aer2* 5' TTTCACCGGTAACAGGATTG 3'.

3.2.3 Protocolo da PCR

A PCR foi realizada usando o kit de reagentes Calbiochem (USA). O protocolo da PCR foi realizado com um volume final da reação de 50 μ L contendo: 5 μ L de DNA, 8 μ L de dNTP (10 mM), 5 μ L do Tampão de PCR (16.6 mM de Sulfato de amônio / 67 mM Tris HCl, pH 8.8 / 6.7 mM MgCl₂ / 10 mM 2-mercaptoetanol), 5 μ L de solução de MgCl₂ (25 mM), 0,25 μ L dos primers (1 mM concentração final), 0,25 μ L da Taq Polimerase (1.25 U de concentração final), e mais H₂O MilliQ completando o volume final.

Os ciclos de amplificação usados foram: desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento dos primers por 1 minuto a 56 °C e extensão dos primers a 72 °C por 1 minuto. Foram realizados 30 ciclos, seguidos de incubação por 5 min a 72 °C. As amostras foram analisadas em gel de agarose a 1,5%. Os produtos da PCR foram visualizados através da coloração do gel com brometo de etídio (5 μ g/mL).

3.3 Tratamento com Alta pressão

3.3.1 Sistema de Alta Pressão Hidrostática (APH)

O sistema utilizado consiste de uma câmara de alta pressão. No interior desta câmara é colocada uma cubeta cilíndrica de quartzo com capacidade de 1,5 mL, que contém a amostra a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão, a cubeta foi selada com um tubo de polietileno, tendo a extremidade

fechada em alta temperatura. O tubo selado permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra dentro da cubeta, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos. A cubeta foi fixada em uma base cilíndrica metálica evitando-se o movimento desta no interior da bomba.

A unidade geradora de pressão é constituída por um pistão operado através de um motor, que injeta etanol por dutos metálicos até a câmara. A medida de pressão foi realizada através de manômetro analógico (Paladini & Weber, 1981). Esquemas e imagens do sistema de alta pressão são apresentados a seguir na figura 2:

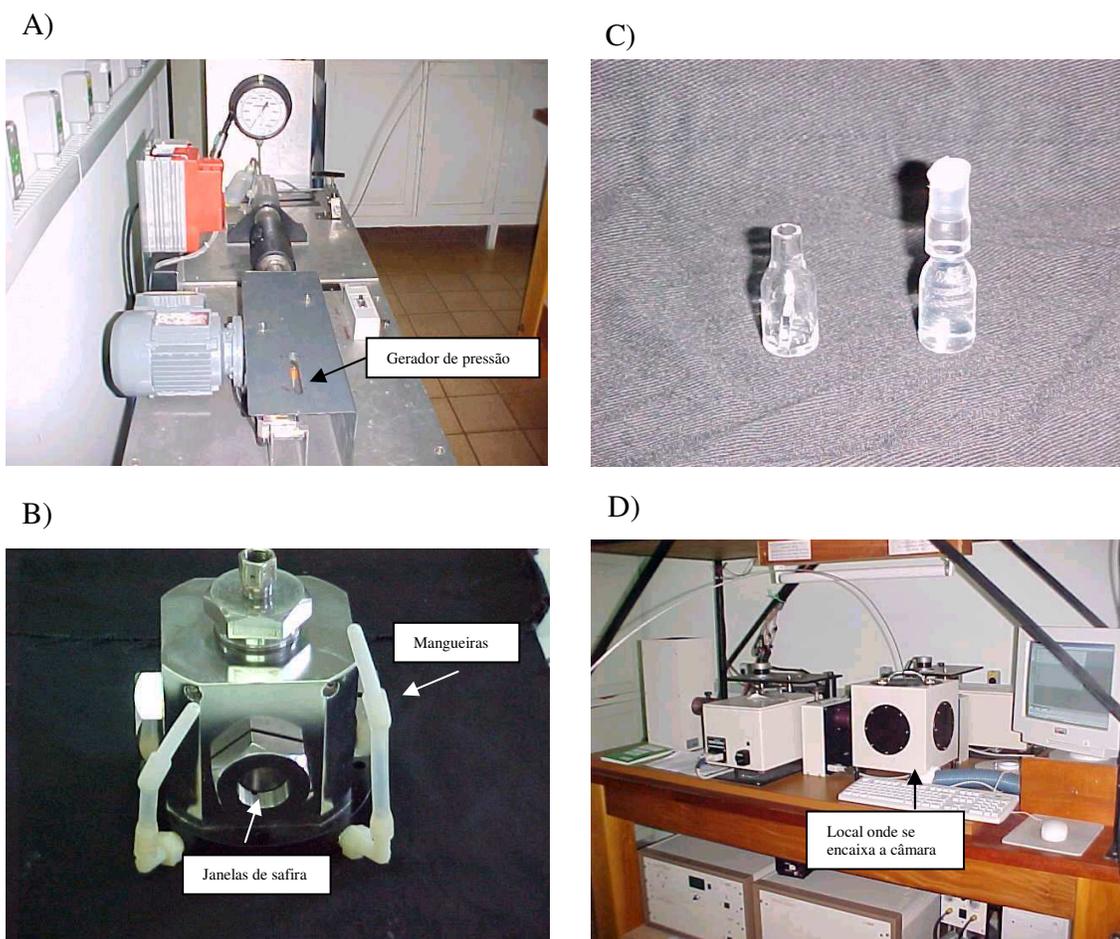


Figura 2. Componentes do sistema de alta pressão hidrostática.

(A) Gerador de pressão. (B) Câmara de pressão onde são colocadas as cubetas para realização dos experimentos, mostrando as janelas de safira por onde passam os feixes de luz para realização das medidas espectroscópicas e as mangueiras onde é conectado o sistema refrigerador. (C) Cubetas de quartzo, selada com tubo plástico de polietileno usado nos experimentos. (D) Fluorímetro e computador, responsável por executar uma série de análises automatizadas por comandos de software específico (Automa).

3.3.2 Preparo da cepa *A. hydrophila* AH 191 para realização de testes de viabilidade celular

A cepa *A. hydrophila* AH 191 foi inicialmente cultivada em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio TSB (caldo tripticase de soja). Os tubos foram incubados a 37 °C por 18-24

h. Em seguida, a cepa foi transferida do tubo para uma placa de TSA (ágar tripticase de soja) através da técnica de plaqueamento, onde ficou incubada por 18-24 h. Alíquotas da cultura bacteriana foram colhidas e ajustadas visualmente através da turbidez para 10^9 UFC/mL em 10 mL de PBS (Tampão Fosfato-Salino) 0,1 M esterilizado usando a escala de MacFarland.

3.3.3 Efeito dos tempos de tratamento em APH e determinação da viabilidade bacteriana de *A. hydrophila* AH 191

As culturas de *A. hydrophila* AH 191 (padronizada no item 3.3.2) foram expostas a uma pressão de 250 MPa, por 2, 5, 10, 15, 20 e 30 min no PBS e por 10, 20 e 30 min a 25 °C (temperatura de processamento) no leite UHT e a sobrevivência bacteriana foi avaliada conforme descrito por Moerman (2005). A viabilidade bacteriana que corresponde a presença ou ausência de células bacterianas viáveis ou não após o tratamento, foi analisada em diluições seriadas preparadas em PBS 0,1 M esterilizado seguido de inoculação em meio de cultura TSA e incubação a 37 °C por 24 h antes da contagem das colônias e determinação da Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL) (Fonberg-Broczek *et al.*, 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3.3.1 Aplicação do choque de alta pressão em *A. hydrophila* AH 191

Buscando condições que pudessem aumentar a eficiência da inativação da bactéria, procedeu-se ao aumento e diminuições abruptas de pressão, onde o choque de alta pressão foi realizado em culturas de *A. hydrophila* AH 191 a 250 MPa, inicialmente por 30 s, 2 min, onde a pressão foi elevada com a válvula fechada. Em seguida, a válvula foi aberta

fazendo com que a pressão inteira fosse distribuída na cubeta contendo a amostra de interesse. Foram aplicadas variações no choque de alta pressão, nas quais, o choque foi dado por 2 e 3 vezes por 30 segundos (com intervalos de 10 segundos). A viabilidade bacteriana foi analisada através de diluições seriadas preparadas em PBS 0,1 M esterilizado, e posteriormente inoculadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 h antes da contagem das colônias e determinação das UFC/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 Preparação do leite contaminado com *A. hydrophila* AH 191

A cepa *A. hydrophila* AH 191 foi cultivada em TSB, e posteriormente inoculada em tubos contendo 4 mL de leite UHT e leite UHT exposto à luz UV (para garantir uma esterilização da superfície), por 30 min, em capela de fluxo laminar, mantido em superfície de placas de Petri estéreis. Amostras do leite contaminado com *A. sobria* AS 69 foi utilizado como controle negativo e amostras do leite contaminado com *A. sobria* 41 foi utilizada como controle positivo. *A. hydrophila* AH 191 foi pressurizada imediatamente após a inoculação no leite (“Tempo 0”) a 250 MPa em 25 °C e pressurizada posteriormente após os tempos de 6, 12 e 18 h de crescimento bacteriano no leite UHT exposto e não exposto ao UV. O leite UHT também foi pressurizado a - 15 °C nos tempos de 18-24 h de crescimento bacteriano. Em seguida as amostras foram centrifugadas (10000 x g, 15 min) e filtradas (Millipore 0,22 µm de poro) para serem utilizadas nos ensaios biológicos que consiste na aplicação das amostras tratadas e não tratadas em células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde africano) e CaCo2 (carcinoma intestinal humano), hemácias de

sangue humano e de carneiro (ensaio de hemólise) e testes em camundongos recém-nascidos (ensaios de enteropatogenicidade).

3.5 Determinação dos títulos de toxicidade de *A. hydrophila* AH 191

A. hydrophila AH 191 foi semeada e incubada em tubos TSB por 18-24 h a 37 °C. Uma pressão de 250 MPa em uma temperatura de 25 °C e -15 °C foi aplicada nas amostras e foi comparada com as amostras controle (sem APH). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10000 x g, 15 min) e filtradas (Millipore 0,22 µm de poro) para serem aplicadas nos ensaios biológicos citado acima no item 3.4. Triplicatas do sobrenadante de cultura (TSB), em diluições seriadas (razão 2) em 0,1 mL de meio MEM (Meio Mínimo de Eagle (Sigma-EUA)), foram adicionadas às cavidades das placas, contendo a monocamada celular. Consideramos como positivo a recíproca da maior diluição capaz de cada amostra induzir efeito citotóxico nas células Vero e CaCo2.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Objetivando encontrar alterações morfológicas que pudessem explicar a inativação de *A. hydrophila* por pressão, foi realizada microscopia eletrônica de varredura nos tempos de exposição de 15 e 20 min a 250 MPa.

3.6.1 Preparação das amostras

As amostras da cepa *A. hydrophila* AH 191 foram submetidas à APH por 15 e 20 min e, em seguida, o material foi filtrado (Millipore 0,2 µm) e fixado no filtro com o uso de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante 2 horas e lavado rapidamente

com tampão PBS 0,1 M. Os espécimes bacterianos foram então expostos a 1% de OsO₄ no mesmo tampão por 1 hora. Realizou-se em seguida uma desidratação progressiva em gradiente alcoólico (30%, 50%, 70%, 90% e 3x 100%), sendo as amostras submetidas a secagem em equipamento de ponto crítico (“Critical Point”. Balzers, CPD 0300). Os espécimes foram acoplados sobre *stubs* para o banho de ouro (“Sputter”. Balzers, SCD 050) (Battistelli *et al.*, 2005). As observações foram realizadas por meio de microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM 5800 LV, Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp).

3.7 Ensaios biológicos (Os ensaios foram realizados em triplicata)

3.7.1 Preparo das culturas celulares

Células Vero e CaCo2, foram obtidas de estoques do Laboratório de Cultura Celular, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, Unicamp. As culturas mantidas em nitrogênio líquido foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37 °C e transferidas para garrafas de cultura de células contendo o meio MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), adicionado de 1% da solução de antibióticos (penicilina 1,000 U/mL e estreptomicina 250 µg/mL). Os frascos de cultura foram incubados em estufa a 37 °C por 48 h.

Após a formação da monocamada celular, o meio de cultura das garrafas foi descartado e as monocamadas lavadas com solução de Hank's (Cellgro, USA) e desfeita com a adição de ATV (associação tripsina-versene). As células foram suspensas em meio de cultura celular, suplementados com soro e acrescidas de 1% de antibióticos.

Para o experimento, o número de células foi estimado em câmara de Newbauer (2,5 x 10⁵ células/mL) e a suspensão celular distribuída em placas de 96 poços (COSTAR, Corning -

USA), em volume de 0,1mL por cavidade. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas e, em seguida, foram utilizadas para os ensaios biológicos.

3.7.1.2 Ensaio de atividade citotóxica sobre cultura de células Vero e CaCo2

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (Costar, Corning, MA, E.U.A.) e as amostras foram aplicadas e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ (JOUAN IG 50), por 24 h. Os sobrenadantes de cultura de *A. hydrophila* AH 191, *A. sobria* AS 69 e *A. sobria* 41 e as mesmas amostras semeadas em leite UHT, pressurizadas ou não, foram aplicadas nas células cultivadas. Mudanças na morfologia celular foram acompanhadas por até 48 h de observação. As alterações morfológicas, assim como as resultantes de processos de vacuolização celular, descolamento celular e destruição de monocamadas foram monitorados com o auxílio de microscópio invertido (TE 300, Nikon).

3.7.2 Ensaio para a detecção da atividade hemolítica

Foram realizados segundo as metodologias descritas por Ljungh *et al.* (1981) e Falcón *et al.* (2003), na qual suspensões contendo eritrócitos humano e de carneiro foram preparados a 1% em tampão PBS 0,05 M e dispensados v/v sobre soluções contendo diluições seriadas na razão 2 do sobrenadante de cultura contendo a toxina, sendo a concentração inicial de 50 µg/mL em tampão PBS.

As misturas foram incubadas a 37 °C por 1 h e a 4 °C por 12 h. A eficácia da APH foi considerada quando os sobrenadantes de cultura contendo a hemolisina não promoveram a lise dos eritrócitos (leitura visual). Foi usado como controles positivos o sobrenadante de *A. hydrophila* AH 191, *A. sobria* 41 e como controle negativo o sobrenadante de cultura da amostra de *A. sobria* AS 69.

3.7.3 Estudo da Enteropatogenicidade

3.7.3.1 Teste em camundongos recém nascidos (CRN). Protocolo nº 1880-1.

O teste em camundongos *Swiss* recém-nascidos foi realizado segundo a técnica descrita por Dean *et al.* (1972), utilizando 4 animais por teste, de 2 a 4 dias de idade (ensaio repetido 2 x), com inclusão de animais como controle positivo e negativo. Foram adicionados 2% da solução de azul de Evans aos sobrenadantes de cultura das amostras submetidas à pressurização ou não, e 50 µL desta mistura foi inoculada, por via oral-gástrica, no estômago dos camundongos. Após 4 h os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, e o intestino dos mesmos foi removido com o auxílio de uma pinça. Foi considerado como positivo todo o resultado no qual a relação entre o peso intestinal e o peso da carcaça (PI/PC), que corresponde ao animal sem o intestino, apresentou valor igual ou superior a 0,08. Este teste corresponde em uma avaliação da enterotoxicidade baseada no acúmulo de líquido intestinal, no qual aumenta o peso do intestino do animal.

4. RESULTADOS

4.1 Teste para amplificação do gene da aerolisina

Visando confirmar a presença do gene *aer* de *A. hydrophila* AH 191 na busca de um produto de 209 pb, as amostras bacterianas foram avaliadas através da PCR para a pesquisa deste gene que é produtor da aerolisina. Na figura 3, podemos observar na posição 2 e 4 do gel a presença do gene de interesse amplificado.

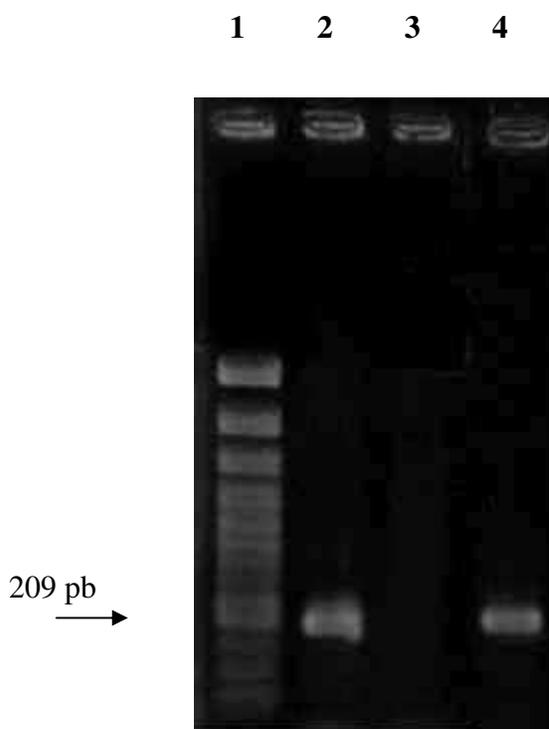


Figura 3. Ocorrência e distribuição do fragmento de amplificação do gene *aer* de *Aeromonas* spp.: amplificação do fragmento de 209 pb do gene *aer* pela PCR. Posição 1- padrão de 100 pb (ladder). Posição 2- amostra padrão: *A. hydrophila* AH 191. Posição 3- *A. sobria* 69. Posição 4- *A. sobria* 41. Somente as amostras da posição 2 e 4 (AH 191 e AS 41) apresentaram o produto referente a uma dada região do gene da aerolisina (*aer*).

4.2 Tratamento com APH e curva de sobrevivência bacteriana

A figura 4 mostra a inativação de *A. hydrophila* AH 191 por APH. A extensão da inativação foi proporcional à duração de exposição a 25 °C, onde a pressão de 250 MPa por 30 min resultou na inativação de 9 log de UFC/mL (10^9 UFC/mL para 0 UFC/mL).

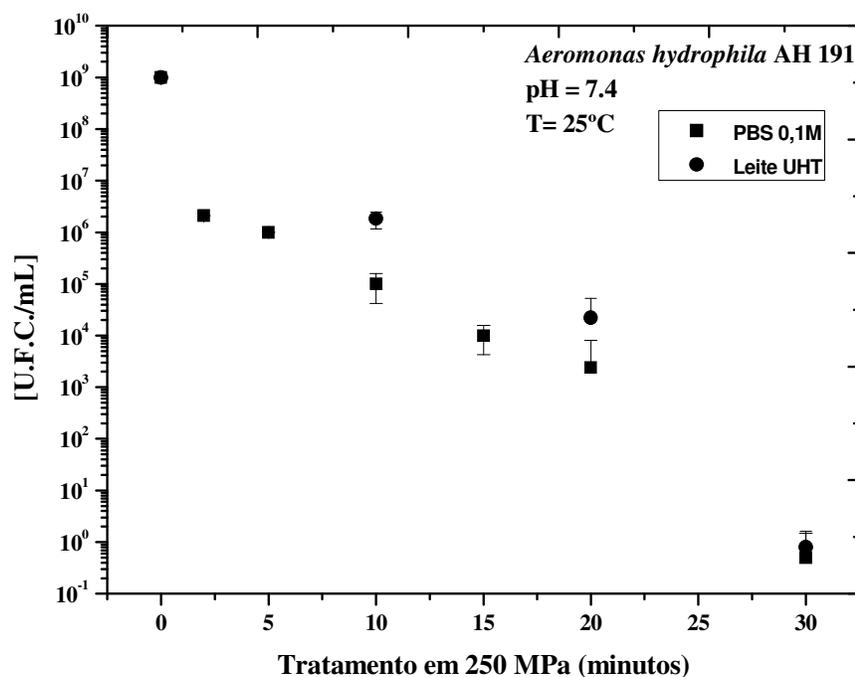


Figura 4. Curva de sobrevivência de *A. hydrophila* AH 191 em função do tempo de tratamento em 250 MPa. Obs.: Os quadrados (■) e os círculos (●) mostram a média dos resultados feitos em triplicata. As barras correspondem aos desvios-padrão.

4.2.1 Tratamento com o choque de alta pressão sobre a viabilidade de *A. hydrophila* AH 191.

Observa-se na figura 5 que o choque de alta pressão não promoveu inativação da cepa *A. hydrophila* AH 191 que justificasse maior atenção. Um choque de 250 MPa com um tempo de exposição em alta pressão de 30 s foi suficiente para a inativação bacteriana em aproximadamente 2 log. No choque de APH com exposição por 2 min, também se pode observar redução de cerca de 2 log. No entanto, a repetição de choque de alta pressão por 2 ou 3 vezes não contribuiu para inativação adicional da bactéria.

Comparando com os resultados da figura 4, que apesar de não ser realizado choque de alta pressão, podemos sugerir que o choque não promoveu inativação significativa, mas deve existir parte da população bacteriana sensível à alta pressão, mesmo por tempo de tratamento na ordem de segundos, (onde o limite da inativação para o tempo tendendo a zero são de 2 log) o que é um bom resultado.

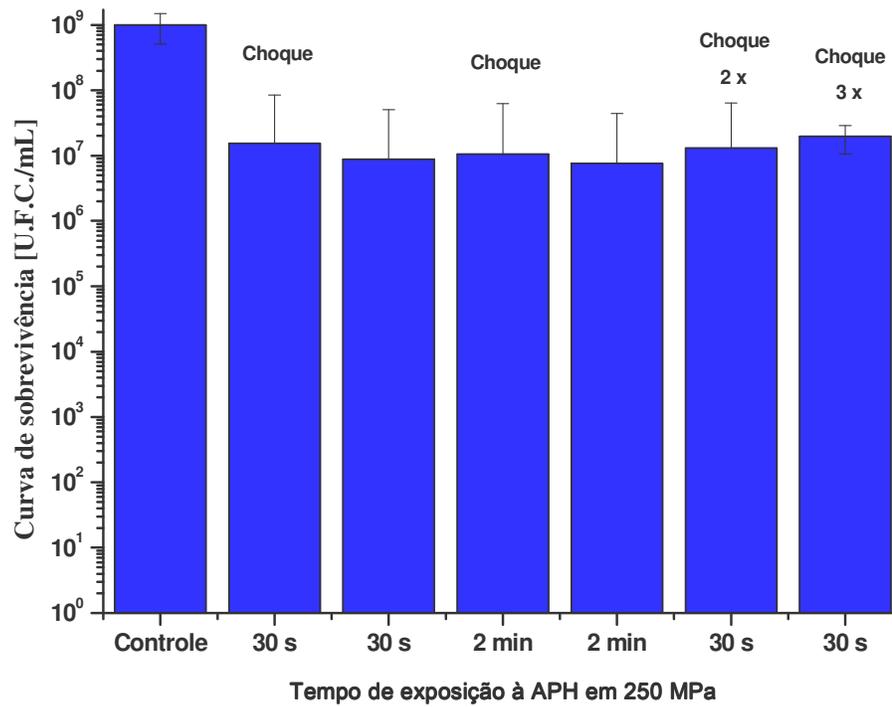


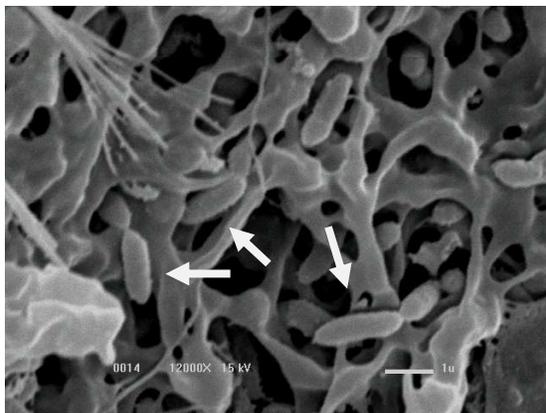
Figura 5. Efeito do choque de alta pressão hidrostática na cepa *A. hydrophila* AH 191.

Os ensaios foram realizados em triplicata (valores de $P < 0,05$). Choques realizados por 30 s e 2 min, em seguida aplicações de 2 e 3 x por 30 s (intervalos de 10 s antes da próxima aplicação).

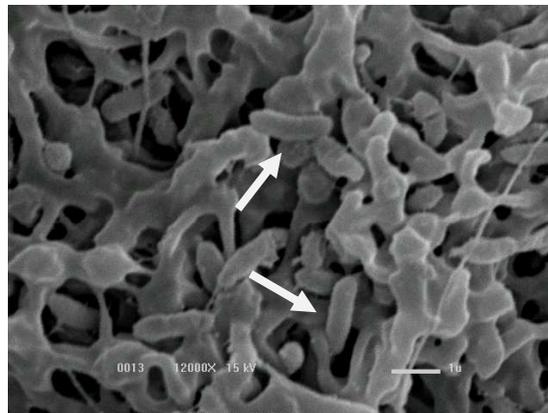
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na figura 6, pode ser observado alongamento das células bacterianas após os tempos de exposição de 15 e 20 min em APH (250 MPa).

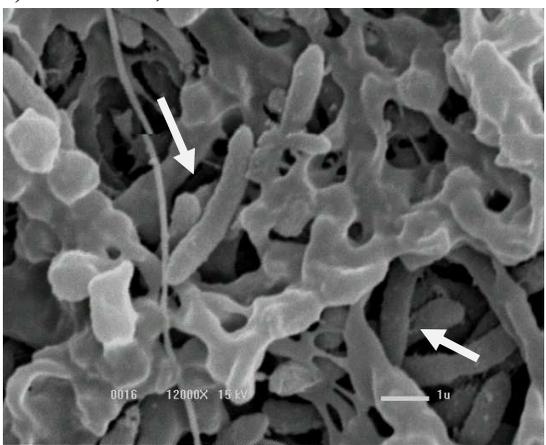
a) Controle



b) Controle



c) 250 MPa, 15 min



d) 250 MPa, 20 min

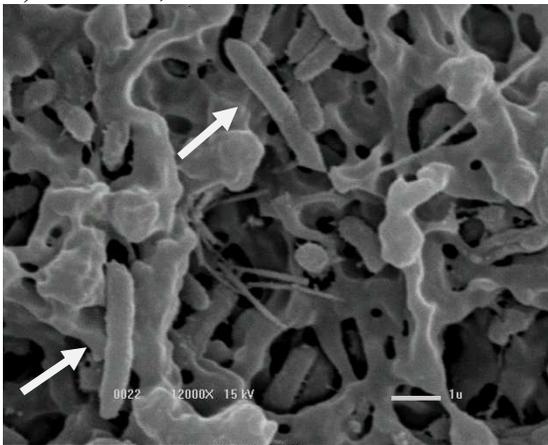


Figura 6. Microscopia Eletrônica de Varredura da cepa *A. hydrophila* AH 191. (a) e (b) *A. hydrophila* não pressurizada, (b) *A. hydrophila* pressurizada por 15 min e (c) pressurizada por 20 min, 250 MPa, 25 °C.

4.4 Efeito da APH em toxinas de *A. hydrophila* AH 191

Embora a inativação de bactérias por alta pressão seja um aspecto importante de ser atingido visando conservação de alimentos, os produtos de uma contaminação, como as toxinas, podem ser altamente indesejáveis. Neste caso, é de grande interesse conhecer os efeitos de alta pressão sobre as mesmas, pois uma eventual inativação seria obviamente de grande interesse. Neste sentido, estudamos o efeito de alta pressão na atividade biológica das toxinas produzidas por *A. hydrophila*. Foram feitos ensaios com aerolisina (toxina que induz alterações importantes na fisiologia normal nos seres humanos) após tempo de exposição em alta pressão em meio de cultura e em leite UHT. Observa-se pouca diferença entre os títulos de toxicidade mediados pela aerolisina em diferentes substratos. Nota-se, assim, a capacidade de *A. hydrophila* AH 191 de crescer em diferentes substratos e excretar toxinas, sem alterações significativas após tratamento com APH (figura 7).

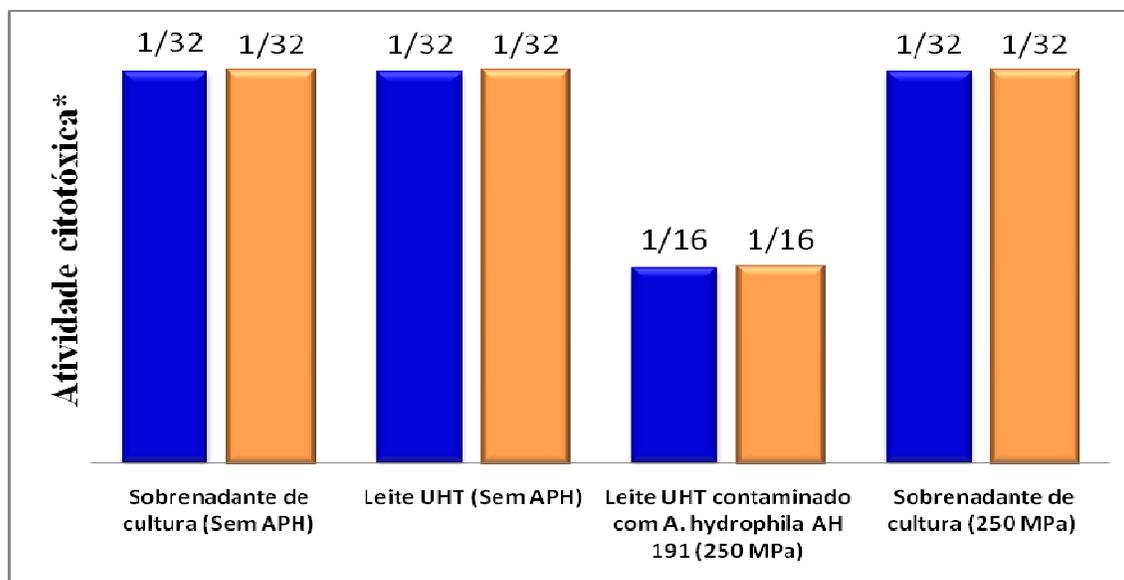
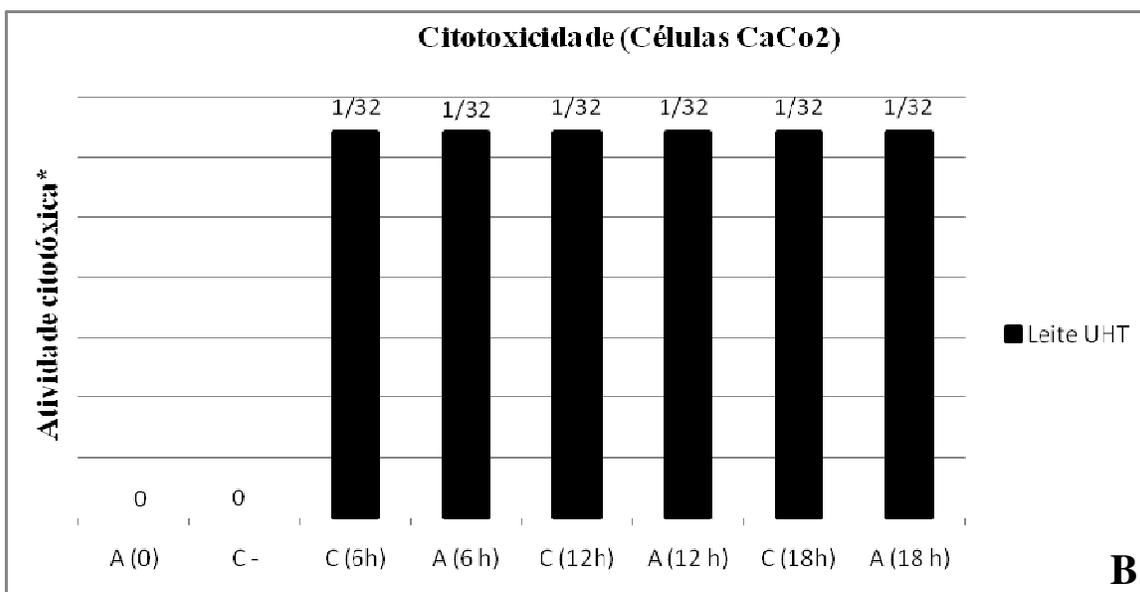
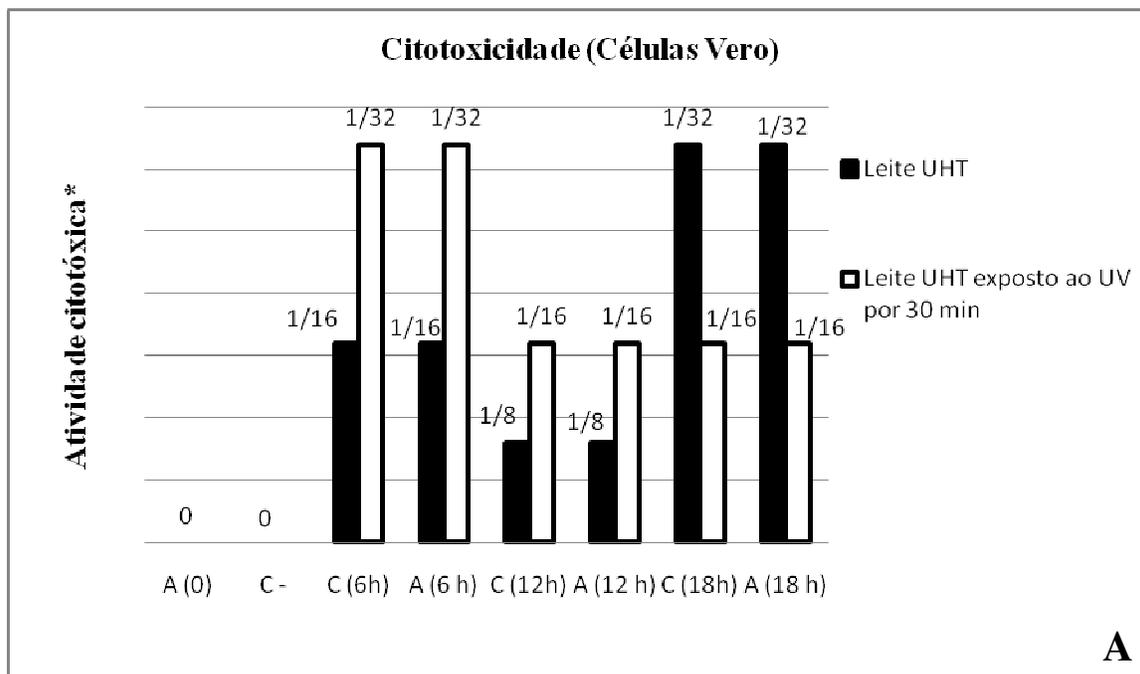


Figura 7. Determinação da atividade citotóxica de *A. hydrophila* AH 191. Amostra cultivada em meio TSB e em leite por 18-24h, submetidas à APH e aplicadas em culturas de células Vero. Amostras de Leite UHT e o sobrenadante (TSB) foram pressurizados a -15 °C (Barras azuis) e 25 °C (Barras laranja).

*A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que induziu efeito citotóxico.

Em busca de mais esclarecimentos quanto à exposição do sobrenadante de cultura contendo as toxinas de *A. hydrophila* AH 191 à APH, foram feitos testes com o mesmo, seguindo para os ensaios biológicos para uma avaliação da atividade biológica após o tratamento do sobrenadante contendo a toxina. A figura 8 (A e B) mostra que *A. hydrophila* AH 191 crescida em leite (6, 12 e 18 h) e exposta a APH demonstrou atividade citotóxica em células Vero e CaCo2 similar ao controle (não submetido a APH). Observou-se também que as propriedades de hemólise não alteraram significativamente as amostras expostas à APH, como foi demonstrado pelos ensaios realizados com eritrócitos humanos e de carneiro (figura 8 C).

Em células CaCo2, títulos de toxicidade de 1/32, no ensaio hemolítico 1/2 e 1/4, nos ensaios de enterotoxicidade, foram observados similares acúmulos de fluido em amostras tratadas em diferentes incubações da bactéria em leite e amostras não tratadas com APH (Figura 8 D).



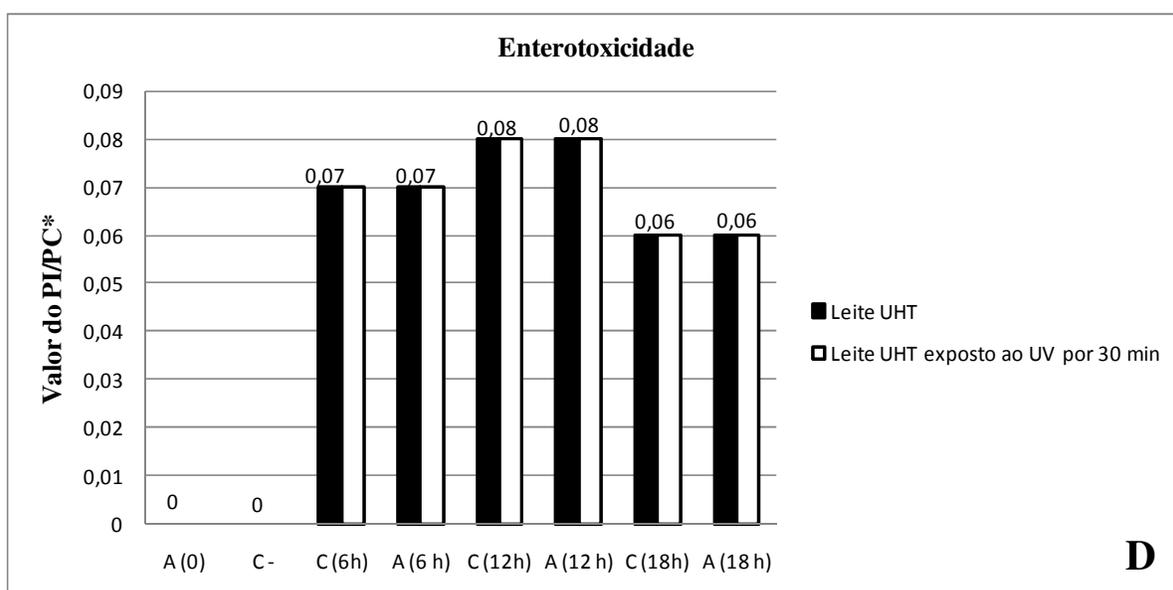
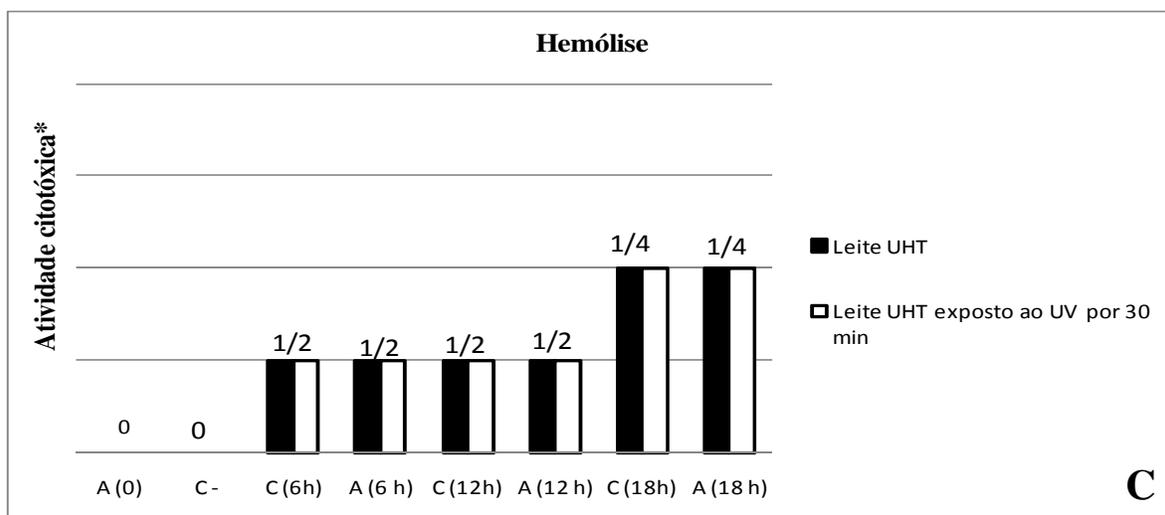


Figura 8. Ensaio com o leite contaminado com *Aeromonas* crescida em diferentes tempos. Amostras tratadas em 250 MPa a 25 °C, 30 min. A (0) = *A. hydrophila* AH 191 inoculada no leite e imediatamente pressurizada. C - = controle negativo (*A. sobria* 69 no leite em pressão atmosférica). C (6h), C (12h), C (18h) = *A. sobria* AS 41 crescida no leite em diferentes tempos. A (6h), A (12h), A (18h) = *A. hydrophila* AH 191 crescida no leite em diferentes tempos e pressurizada.

*A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que induziu efeito citotóxico.

Na figura 8 D, **Valores de PI/PC** = Peso do Intestino / Peso da Carcaça.

Buscando condições associadas à APH que pudessem promover inativação das toxinas, pois apenas a pressão não inativa as mesmas, os sobrenadantes de cultura bacteriana foi tratado a 250 MPa em diferentes temperaturas, de 25 °C e -15 °C, testando-se a citotoxicidade e hemólise (figura 9), onde se usou baixa temperatura para tentar induzir mudanças conformacionais nas toxinas, visto que em baixas temperaturas a uma maior probabilidade de alterações estruturais protéicas sob alta pressão (Dumay *et al.*, 2006). Como pode ser observado, também nessas condições as atividades não sofreram alterações por alta pressão nas duas temperaturas estudadas.

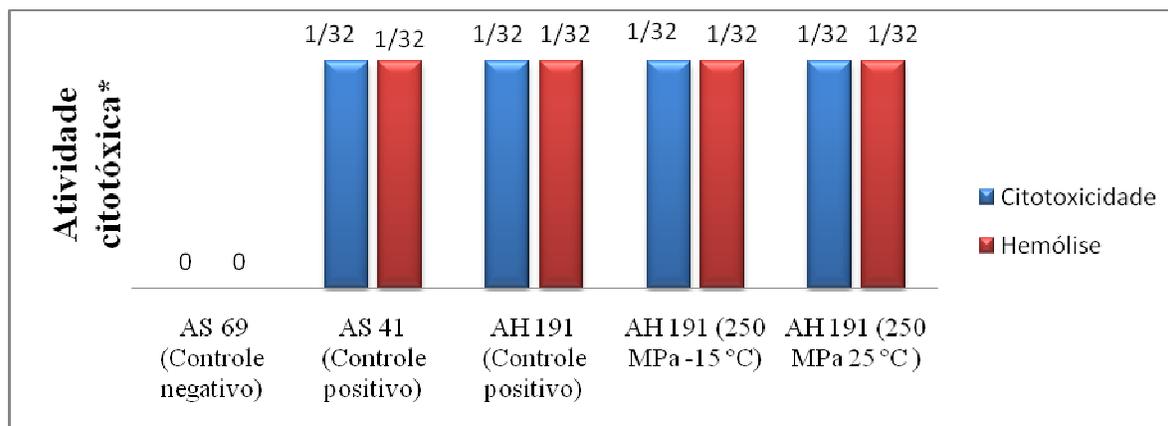


Figura 9. Tratamento com APH na atividade biológica das toxinas presente no sobrenadante de cultura bacteriana de *A. hydrophila* AH 191. Controles positivo e negativo tratados a 250 MPa por 30 min. Cepas crescida por 18 a 24 h no TSB. Obs.: AS 69 = *A. sobria* 69, AS 41 = *A. sobria* 41, AH 191 = *A. hydrophila* AH 191. Amostras aplicadas em células CaCo2.

*A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que induziu efeito citotóxico.

As figuras 10 a 12 mostram os efeitos das toxinas em células Vero e CaCo2: os resultados estão relacionados aos testes mostrados nas figuras 8 e 9.

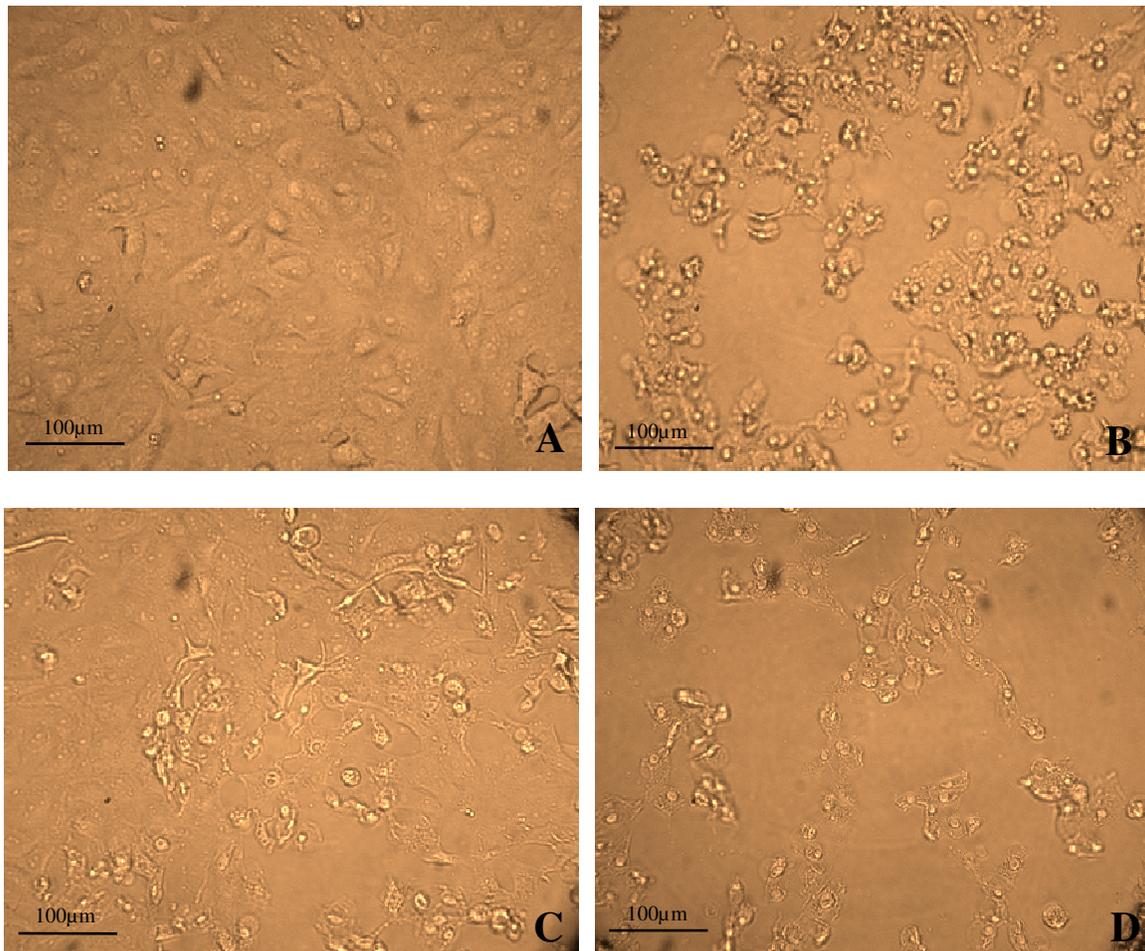


Figura 10. Microscopia óptica de células Vero exposta ao sobrenadante de cultura de *A. hydrophila* AH191. Controle celular (A) e controle positivo (sobrenadante de cultura de *A. hydrophila* AH 191 não pressurizado) (B). Sobrenadante pressurizado em 250 MPa por 30 min em 25 °C (C) e -15 °C (D). Observa-se nas figuras (B), (C) e (D), descolamento celular e destruição da monocamada. Aumento: 20X. (Células Vero = 5 μm).

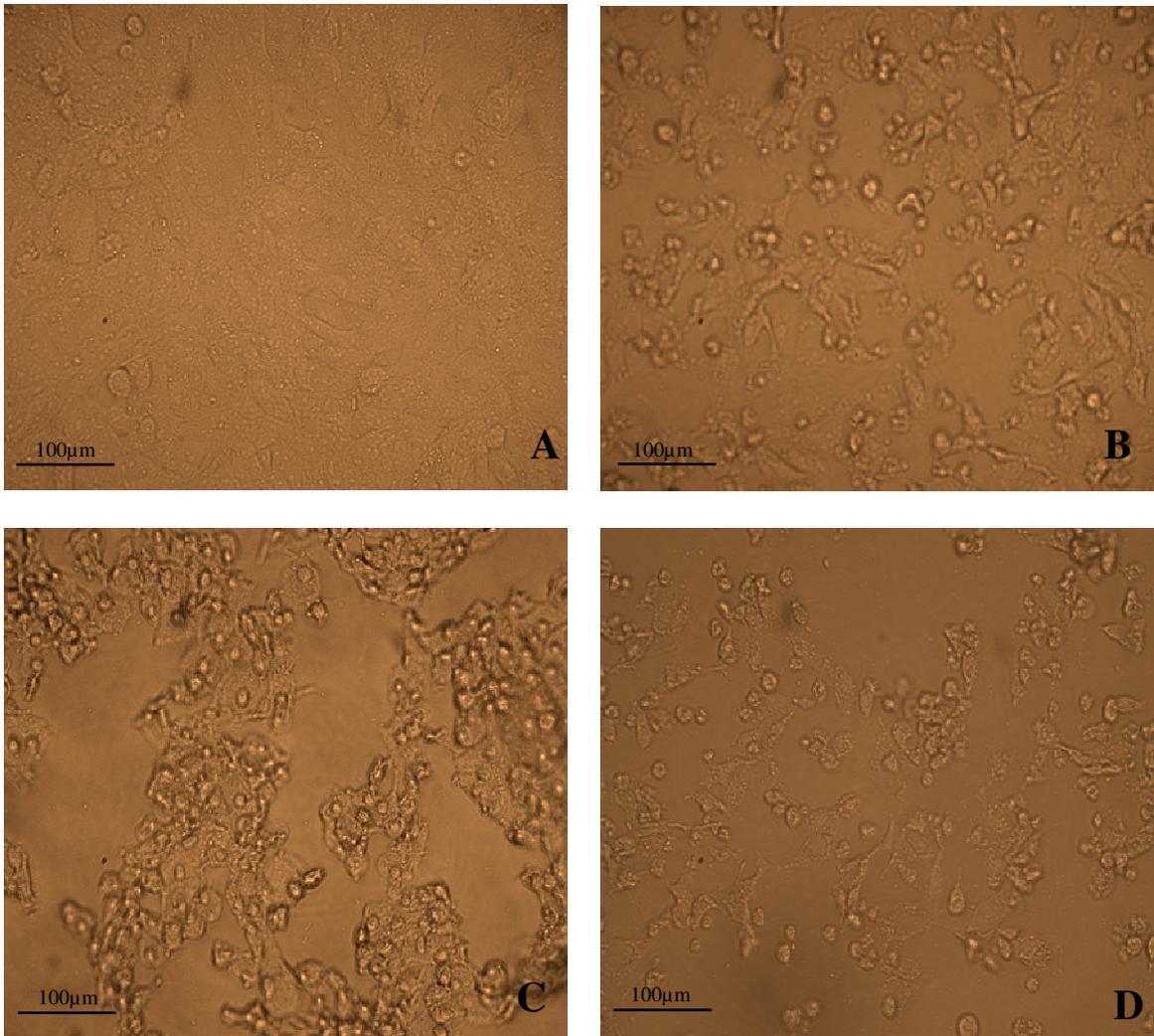


Figura 11. Microscopia óptica de células Vero expostas ao leite contaminado com *A. hydrophila* AH 191 crescida em diferentes tempos. Controle celular (A). Amostras de *A. hydrophila* AH 191 crescidas no leite por 6 (B), 12 (C) e 18 (D) horas e em seguida tratadas com 250 MPa por 30 min, 25 °C. Nas figuras (B), (C) e (D), podem ser observados efeitos descolamento e destruição da monocamada. Aumento: 20 X. (Células Vero = 5 μm).

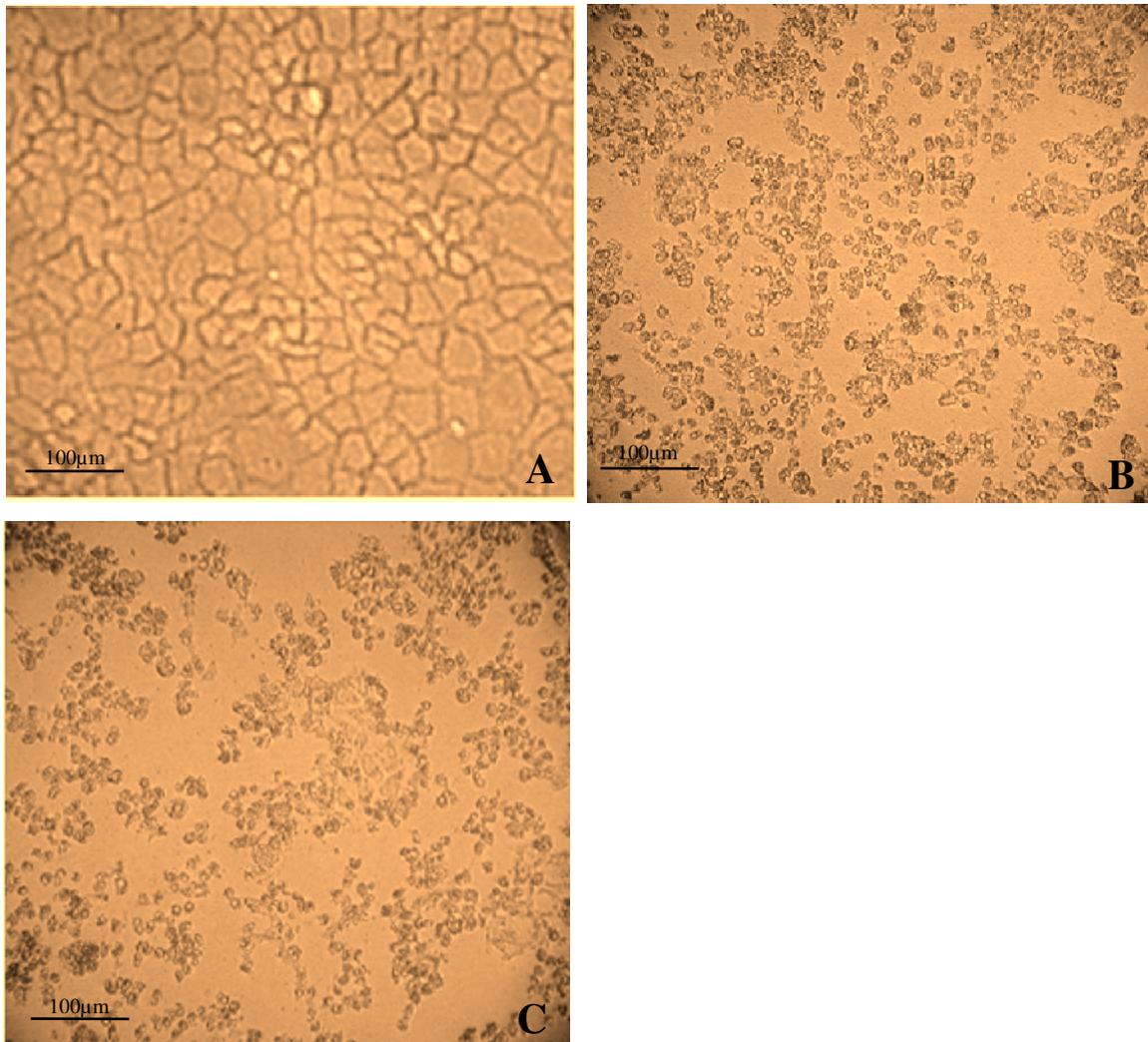


Figura 12. Microscopia óptica de células CaCo2 expostas ao leite UHT contaminado com *A. hydrophila* AH 191. Controle sem exposição ao leite contaminado (A). Leite contaminado com *A. hydrophila* AH 191 tratado com 250 MPa por 30 min, 25 °C (B) e -15 °C (C), nas quais podem ser observados descolamento celular e destruição da monocamada. Aumento: 20 X. (Células CaCo2 = 5 µm). As amostras foram crescidas no leite UHT por 18-24 h.

5. DISCUSSÃO

A qualidade e a segurança dos produtos alimentares são os dois fatores que cada vez mais influenciam as escolhas feitas pelos consumidores. Para isso, o uso da APH para propor a redução da carga microbiana tem sido muito utilizado para melhorar a qualidade dos alimentos (Smelt, 1998).

Levando em consideração que *A. hydrophila* é frequentemente isolada de leite e derivados (Bulhões & Rossi Júnior, 2002; Daskalov, 2006; Arcuri *et al.*, 2008) e também o fato de existirem relatos de inativação de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* no mesmo alimento (Castellví *et al.*, 2005; Koseki *et al.*, 2008) dentre outras espécies bacterianas, entretanto, não foram encontrados na literatura estudos sobre a inativação de *A. hydrophila* neste mesmo substrato, o que nos motivou com o estudo da inativação da mesma por pressão. Diversos estudos também têm investigado a sensibilidade de patógenos no leite usando a APH (Gervilla *et al.*, 1997a, b, 1999a, b; Trujillo *et al.*, 2002). Como pode ser observado neste estudo, a APH inativou significativamente *A. hydrophila*, cepa AH 191, sendo o grau de inativação diretamente proporcional ao tempo de exposição à alta pressão (Figura 4).

Fez-se também o denominado “choque de alta pressão”, que consiste em um aumento e em uma diminuição abrupta de pressão, como tentativa de aumentar a eficiência de APH na inativação da bactéria. O choque de alta pressão em condições diferentes, proporcionou uma inativação de 2 log de UFC/mL nos respectivos tempos de 30 segundos e 2 minutos (figura 5). Essa inativação aparentemente ocorre nos experimentos de alta pressão realizados, sugerindo que exista uma população bacteriana sensível à pressão, independente da velocidade de aumento ou diminuição da mesma.

Já a inativação de *A. hydrophila* AH 191 no leite UHT por alta pressão, foi cerca de 4 log de UFC/mL a 10 min, 6 log em 20 min e 9 log em 30 min no leite UHT, um valor muito relevante em um tempo relativamente curto, o que relata a novidade e relevância do estudo por ser um resultado importante para a segurança alimentar e pelo fato de não existir este tipo de achado.

Conforme a tabela 1, alguns exemplos de espécies inativadas no leite por Alta Pressão Hidrostática podem ser observados.

Tabela 1. Inativação bacteriana induzida por alta pressão hidrostática em leite.

Microrganismo	Condições de tratamento ^a	Inativação (log UFC.mL ⁻¹)	Tipo de leite	Referência
<i>B. cereus</i> INRAAV Z4222	500 MPa/15 min/60 °C	5,6	Cru	OPSTAL et al. (2004)
<i>B. cereus</i> INRAAV Z4222	200 MPa/15 min/45 °C e 200 MPa/10 min/60 °C	6,1	Cru	OPSTAL et al. (2004)
<i>B. cereus</i> NCFB 1031	400 MPa/18 min/8 °C	5,5	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>E. coli</i> MC1061	500 MPa/5 min/20 °C	6,5	Reconstituído	BLACK et al. (2005)
<i>E. coli</i> 0157:H7 NCTC 12079	700 MPa/15 min/40 °C	8,0	UAT	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>E. coli</i> 0157:H7 NCTC 12079	200 MPa/15 min/60 °C	8,0	UAT	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	600 MPa/10 min/20 °C	7,5	UAT integral	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	400 MPa/24 min/8 °C	6,0	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>L. innocua</i> 4202	500 MPa/5 min/20 °C	3,8	Reconstituído	BLACK et al. (2005)
<i>S. aureus</i> NCTC 10652	600 MPa/30 min/20 °C	5,0	UAT	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>S. aureus</i> As 1.2465	330 MPa/15 min/34 °C	6,0	UAT integral	HUPPERTZ et al. (2006a)
<i>P. fluorescens</i> ANA11	250 MPa/18 min/8 °C	5,5	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>P. fluorescens</i> NCDO 1524	250 MPa/18 min/8 °C	6,0	UAT desnatado	MCCLEMENTS et al. (2001)
<i>P. fluorescens</i> M114	300 MPa/5 min/20 °C	8,2	10% RSM-A	BLACK et al. (2005)

^aOs dados correspondem a condições mínimas de processamento para uma máxima inativação. Tabela adaptada de Pflanzler *et al.* (2008).

Estudos anteriores têm encontrado resultados satisfatórios na inativação da espécie *A. hydrophila* por APH. Estudos de Ellenberg & Hoover (1999), relataram uma inativação de cerca de 6 log de UFC/mL na inativação de *A. hydrophila* 7965 em carne de porco submetida a 250 MPa, em temperatura ambiente e pH 7,0 por 15 minutos. Da mesma forma, Fonberg-Broczek *et al.* (2005) relataram uma redução na população de bactérias em

queijo curado tipo Gouda inoculados com *A. hydrophila* anteriormente expostos a 300 MPa. Em contraste com os relatos de inativação de bactérias pela APH, não foi encontrado na literatura estudos que examinam o efeito deste tratamento sobre a atividade biológica das toxinas bacterianas, apesar do potencial de aplicação da APH na esterilização de alimentos, o que faz de fato o estudo ser o primeiro relato.

Sabe-se que a APH pode causar lesões na parede celular nos micro-organismos - primeiro alvo - como também rupturas da membrana celular (Hoover *et al.*, 1989). A membrana celular é composta por uma bicamada de fosfolipídeos com proteínas funcionais, que exercem um importante papel nos transporte de íons e também de outras substâncias. O efeito da alta pressão em membranas pode ser devido ao fato dos lipídios serem particularmente sensíveis a pressão, inicialmente em uma ordem de magnitude de maior compressibilidade do que nas proteínas (Fernandes, 2005).

Danos intracelulares em diferentes micro-organismos têm sido estudados por pesquisadores através de observações sob um microscópio eletrônico de transmissão (Hoover *et al.* 1989; Malone, A. S., Shellhammer, T. H., Courtney P. D., 2002; Moussa, M., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P., 2007). Separação da parede celular da membrana citoplasmática, células com paredes espessadas sem estrutura de membrana, zonas claras que aparentam estruturas esponjosas ou reticulares no citoplasma, e uma diminuição do número de ribossomos foram relatados nos estudos de Hoover *et al.* (1989). Ritz *et al.* (2001, 2002) usando microscopia eletrônica de varredura, relataram a ocorrência de “cicatrizes”, “manchas” na superfície celular de *Listeria monocytogenes* depois de 10 minutos de tratamento, numa pressão de 400 MPa em tampão citrato. Contudo, não foram encontrados relatos que mostrem alterações morfológicas celulares de *A. hydrophila*

quando exposta a APH, o que faz ser um estudo pioneiro sobre alterações morfológicas deste patógeno sob APH.

Em nossos resultados, análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que a APH foi capaz de provocar alterações na morfologia de *A. hydrophila* AH 191. As células bacterianas apresentaram aspecto alongado na qual se mantinha com o aumento do tempo de exposição a APH (Figura 6), indicando provavelmente, sinais de lesões celulares, o que pode sugerir como um fator importante que leva à inativação bacteriana.

Produtos alimentares estão frequentemente associados a surtos de toxi-infecção causados por *A. hydrophila* (Szczawiński *et al.*, 1997; Fonberg-Broczek *et al.*, 2005). Esta contaminação pode ser minimizada pelo uso de um processo adequado de esterilização de alimentos, capaz de destruir micro-organismos patogênicos e suas toxinas associadas (Palumbo *et al.*, 2001).

Diversos estudos mostram que *A. hydrophila* produz uma variedade de fatores de virulência (Asao *et al.*, 1984; Cahill, 1990; Kirov, 1997), sendo a aerolisina o melhor caracterizado (Watson *et al.*, 1985; Buckley & Howard, 1999). Portanto, no presente estudo, foram realizados ensaios para a detecção e confirmação da presença do gene *aer*, referente à aerolisina, nas amostras de *Aeromonas spp.* através da PCR. Dentre as amostras estudadas, *A. hydrophila* AH 191 e *A. sobria* 41 apresentaram amplificação para o gene *aer* (figura 3), o que motivou seu estudo nos ensaios com APH.

Como sabe-se que vários métodos podem conduzir a uma perda de função de determinadas proteínas, como altas e baixas temperaturas, agentes desnaturantes, e também o uso de alta pressão hidrostática (Lullien-Pellerina & Balnyb, 2002; Kunugi & Tanaka,

2002; Pivovarova *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2008), outro alvo de estudo foi o efeito da APH em diferentes temperaturas em toxinas como a aerolisina.

No estudo, foi utilizado também a APH com o intuito de alterar a atividade biológica da aerolisina. Esta técnica, na qual ocorre com a contração de volume do sistema, é usada para dissociar proteínas. A dissociação geralmente ocorre até 250 MPa, e sem alterar diretamente a estrutura terciária das subunidades. (Weber & Drickamer, 1983; Silva *et al.*, 1986; Bonafe *et al.*, 1991).

Neste trabalho, uma pressão de 250 MPa foi aplicada utilizando temperatura de 25 e -15 °C, o que não causou alterações na atividade da aerolisina presente no sobrenadante de cultura bacteriana de *A. hydrophila* AH 191 ou no leite contaminado pela mesma (Figuras 7 a 9). A atividade da toxina no estado monomérico explica esses achados, sendo também possível o processo de reassociação pós pressão. Fivaz *et al.* (1999) mostraram que esta toxina pode existir tanto na forma monomérica ou oligomérica. Estudos subsequentes baseados em cristais bi-dimensionais e medidas de espectrometria de massas dos oligômeros de aerolisina mostraram também que a toxina pode estar associada na forma de heptâmeros (Moniatte *et al.*, 1996). Gouaux, E. (1997) mostra que a aerolisina modifica do seu estado monomérico (solúvel em água) para o “estado de oligomerização” (heptâmeros) quando se liga a receptores de membrana, retornando ao seu estado monomérico quando não ligada.

Lesões celulares também ocorreram nos ensaios de citotoxicidade, em que experimentos realizados neste estudo indicaram que a enterotoxina citotóxica da *A. hydrophila* AH 191 não tratada por APH causou intensa vacuolização em células Vero e CaCo2 (Figura 10, 11 e 12). Estes resultados são similares aos dados relatados para a ação desta toxina sobre células CHO (ovário de hamster chinês) (Rose *et al.*, 1989), Vero

(Falcón, 1998, 2001) e CaCo2 (Guimarães, 2002). Porém, as toxinas que também foram submetidas à alta pressão ainda permaneceram com a atividade citotóxica, efeitos estes possivelmente mediados pela aerolisina (Abrami, 1998). Outras toxinas produzidas por *A. hydrophila*, como citotoxinas, enterotoxinas e hemolisinas também podem danificar estes tipos de células, assim como células HT-29 (Ferguson *et al.*, 1997; Abrami *et al.*, 1998b; Falcón *et al.*, 2001).

Entre outras propriedades funcionais da enterotoxina citotóxica, também se tem demonstrado a sua capacidade de induzir uma ampla variedade de efeitos biológicos, apresentando atividade enterotóxica em camundongos recém-nascidos, assim como em alça ligada de coelhos, causando acúmulo de líquidos fluidos (Asao *et al.*, 1984; Abrami *et al.*, 1998a,b; Carrello *et al.*, 1988; Ferguson *et al.*, 1997; Fadl *et al.*, 2007),

Estudos sobre a ação da aerolisina de *A. hydrophila* também revelaram que esta toxina induz a formação de canais nas células, provocando lise osmótica nos eritrócitos e outros tipos de membrana (Buckley & Howard, 1999; Thelesman & Ljungh, 1981). Dependendo do tipo de hemácia, a perda de pequenas moléculas e íons, especialmente potássio, acontece em consequência da formação de poros, levando à despolarização da membrana e, portanto à morte celular (Ferguson *et al.*, 1995).

No presente estudo, também é importante ressaltar que os picos de citotoxicidade atingidos pelos prováveis efeitos da aerolisina realizados em diferentes substratos, como o leite UHT e TSB sob alta pressão hidrostática (250 MPa), apresentaram toxicidade similares quando comparados com o controle, mostrando algumas diferenças nos títulos de toxicidade, porém, as toxinas mantiveram sua ação citotóxica (Figura 7).

Contudo, nossos resultados mostram que as toxinas de *A. hydrophila* AH 191, tanto experimentadas com o leite contaminado, quanto no sobrenadante de cultura, continuam

exercendo suas atividades biológicas, mesmo tratamento com APH (Figura 8 e 9), demonstrando a baixa eficiência desta pressão de 250 MPa na eliminação da atividade biológica das toxinas de *A. hydrophila* AH 191, porém, eficaz na inativação bacteriana. Desta forma, este estudo indica a importância da utilização da APH nos primeiros estágios do processamento de alimentos, quando a contaminação bacteriana e, conseqüentemente, a produção das toxinas, é minimizada.

O uso precoce da APH poderia reduzir o risco de intoxicação por toxinas produzidas por *A. hydrophila*. Apesar de não serem examinadas no estudo, outras toxinas bacterianas envolvidas em doenças de origem alimentar, como as toxinas de *Clostridium botulinum* e de *Escherichia coli* enterohemorrágica, podem também apresentar perfis de estabilidade em exposição à alta pressão semelhante ao apresentado pela aerolisina, o que reforça a importância da elucidação destas hipóteses em estudos futuros.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento com APH a 250 MPa em uma temperatura de 25 °C, pH 7,4, por 30 minutos, foi eficaz na diminuição a níveis drásticos da cepa *A. hydrophila* AH 191;

- O procedimento de esterilização pela metodologia aplicada no estudo usando à APH não alterou a atividade biológica das toxinas sintetizadas pela cepa bacteriana utilizada neste estudo, quando crescida no leite, assim como, quando ensaiados os sobrenadantes de cultura obtidos em meio TSB.

- A aplicação da APH em estágios prévios do processamento dos alimentos pode propor mais segurança aos consumidores, já que quando há crescimento bacteriano e posteriormente liberação de suas toxinas, a APH não consegue eliminá-las tornando um grande risco para a saúde humana.

7. PERSPECTIVAS

- Associação da APH a outros métodos físicos ou químicos para inativação da toxina poderá ser útil, mas, provavelmente resultará em alterações indesejáveis nas propriedades nutricionais e/ou organolépticas de alimentos tratados por esta técnica.

- Estudos da inativação de *A. hydrophila* em outros substratos podem ser alvos para investigar e se obter um melhor entendimento da eficiência da APH na esterilização dos alimentos.

- Estudos de inativação de outros patógenos de interesse alimentar e de suas toxinas serão importantes com o intuito de elucidar a ação da APH em diferentes cepas.

8. REFERÊNCIAS

- ABE F., KATO, C., HORIKOSHI, K. (1999). Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiology* **7**, 447-453.
- ABRAMI, L., FIVAZ, M., GLAUSER, P.E., PARTON, R.G., VAN DER GOOT, F.G. (1998a). A pore-forming toxin interacts with GP1-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmatic reticulum. *The Journal of Cell Biology* **140**, 525-540.
- ABRAMI, L., FIVAZ, M., DECROLY, E., SEIDAH, M.G., JEAN, T.G., LEPPER, S.H., BUCLEY, T., VAN DER GOOT, F.G. (1998b). The pore-forming toxin pro-aerolysin is activated by furin. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 32656-61.
- ALCAIDE, E., BLASCO, M.D., ESTEVE, C.(2010). Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology* **161**, 40-45.
- ALTWEEG, M. (1999). *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H. (Eds.), 7th (Ed.), Manual of Clinical Microbiology. *American Society for Microbiology*, Washington, DC, pp. 507-516.
- ARCURI, E. F., SILVA, P. D. L., BRITO, M. A.V. P., BRITO, J. R. F., LANGE, C. C., MAGALHÃES, M. M. A. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural* **38**, 2250-2255.

- ASAO, T., KOSAKI, S., KATO, Y., OTSU, K., SAKAKUCHI, G. (1984). Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Journal of Clinical Microbiology* **24**, 228-232.
- BARI, M.D., HACHICH, E.M., MELO A.M.J., SATO, I.Z. (2007). *Aeromonas spp.* and microbial indicators in raw drinking water sources. *Brazilian Journal of Food Microbiology* **38**, 516-521.
- BATTISTELLI, M., BORZÌ, R.M., OLIVOTTO, E., VITELLOZZI, R., BURATTINI, S., FACCHINI, A., FALCIERI, E. (2005). Cell and Matrix Morpho-Functional Analysis in Chondrocyte Micromasses. *Microscopy Research and Technique* **67**, 286-295.
- BONAFE, C.F., VILLAS-BOAS, M., SUAREZ, M.C., SILVA, J.L. (1991). Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 13210-13216.
- BOZOGLU, F., ALPAS, H., KELENTUNC, G. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology Medical Microbiology* **40**, 243-247.
- BOUAOUINA, H., DESRUMAUX, A., LOISEL, C., LEGRAND, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high pressure treatment. *International Dairy Journal*, **16**, 275-284.
- BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *Journal of Food Safety* **7**, 15-29.

- BUCKLEY, J.T., HOWARD, S.P. (1999). The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infection and Immunity* **67**, 466-467.
- BULHÕES, C.C.C., ROSSI JÚNIOR, O.D. (2002). Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **54**, 320-324.
- BUTZ, P., EDENHARDER, R., GARCIA, A., FISTER, H., MERKEL, C., TAUSCHER, B. (2002). Changes in functional properties of vegetables induced by pressure treatment. *Food Research International* **35**, 295- 300.
- BUZRUL, S., ALPAS, H., LARGETEAU, A., DEMAZEAU, G. (2007). Mathematical expression of the temperature profile and experimental determination of compression heating of ethylene glycol during high hydrostatic pressure. *High Pressure Research* **27**, 93-99.
- CAHILL, M.M. (1990). Virulence factors in motile *Aeromonas* species: a review. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 1-16.
- CAMPOS, F. P. (2003). Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology* **6**, 351-357.
- CARRELLO, A., SILUM, K.A., BUDDEN, J.R., CHANG, B.J. (1988). Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells. *Journal of Medical Microbiology* **26**, 19-27.
- CARVALHO-CASTRO, G.A., LOPES, C.O., LEAL, C.A.G., CARDOSO, P.G., LEITE, R.C., FIGUEIREDO, H.C.P. (2010). Detection of type III secretion system genes in

Aeromonas hydrophila and their relationship with virulence in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*.

CLÉRY-BARRAUD, C., GAUBERT, A., MASSON, P., VIDAL, D. (2004). Combined effects of hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 635-637,

CASTELLVÍ, S.L., ROIG-SAGUÉS, A.X., CAPELLAS, M., HERNÁNDEZ-HERRERO, M., GUAMIS, B., 2005. Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* strains inoculated in skimmed milk treated with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 337-342.

CHAKRABORTY, T., HUHLE, B., BERGBAUER, H., GOEBEL., W. (1986). Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **167**, 368-374.

CHEFTEL, J. C. (1991). Application des hautes pressions en technologie alimentaire. *Industries Alimentaires et Agricoles* **108**, 141-153.

CHOPRA, A.K., HOUSTON, C.W. (1999). Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infection* **1**, 1129-1137.

CORNELIS, G.R., 2006. The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 811-825.

DASKALOV, H. (2006). The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* **17**, 474–483.

DEAN, A.G., CHING, Y.C., WILLIAM, R.G., HARDEN, L.B. (1972). Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *International Journal of Infectious Disease* **125**, 407-411.

- DRAKE, M.A., HARRISON, S.L., ASPLUND, M., BARBOSA-CANOVAS, G., SWANSON, B.G. (1997). High Pressure Treatment of Milk and Effects on Microbiological and Sensory Quality of Cheddar Cheese *Journal of Food Science* **62**, 843-860.
- DUMAY, E., PICART, L., REGNAULT, S., THIEBAUD, M. (2006). High pressure–low temperature processing of food proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1764**, 599–618.
- ELLENBERG, L., HOOVER, D.G. (1999). Injury and survival of *Aeromonas hydrophila* 7965 and *Yersinia enterocolitica* 9610 from high hydrostatic pressure. *Journal of Food Safety* **19**, 263-276.
- FADL, A.A., GALINDO, C.L., SHA, J., ZHANG, F., GARNER, H.R., WANG, H.Q., CHOPRA, A.K. (2007). Global transcriptional responses of wild-type *Aeromonas hydrophila* and its virulence-deficient mutant in a murine model of infection. *Microbial Pathogenesis* **42**, 193–203.
- FALCÓN, R.M., CARVALHO, H.F., JOAZEIRO, P.P., GATTI, M.S.V., YANO, T. (2001). Induction of apoptosis in HT29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Biochemistry and Cell Biology* **79**, 525-531.
- FALCÓN, R. M. (1998). Caracterização biológica da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* [dissertação/dissertation]. Campinas: Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
- FALCÓN, R. M., 2003. Mecanismo molecular da patogenicidade da enterotoxina citotóxica *Aeromonas hydrophila* [tese/thesis]. Campinas. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

- FERGUSON, M.R., XING-JING, X., HOUSTON, C.W., PETERSON, J.W., CHOPRA, A.K., 1995. Amino-acid residues involved in biological functions of the cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* **156**, 79-83.
- FERGUSON, M.R., XING-JING, X., HOUSTON, C.W., PETERSON, J.W., COPPENHAVER, D.H., CHOPRA, A.K. (1997). Hyperproduction, purification, and mechanisms of actions of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity* **65**, 4299-4308.
- FERNANDES, P.M.B. (2005). How does yeast respond to pressure?. *Brazilian Journal of Medical Biology Research* **38**, 1239-1245.
- FIVAZ, M., VELLUZ, M.C., VAN DER GOOT, F. (1999). Dimer Dissociation of the Pore-forming Toxin Aerolysin Precedes Receptor Binding. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 37705-37708.
- FONBERG-BROCZEK, M., WINDYGA, B., SZCZAWINSHI, J., SZCZAWINSHI, M., PIETRZAK, D., PRESTAMO, G. (2005). High pressure processing for food safety. *Acta Biochimica Polonica* **52**, 721-724.
- FREITAS, A.C., MILHOMEM, A.M., NUSES, M.P., RICCIARDI, I.D. (1993) Virulence factors produced by *Aeromonas hydrophila* strains isolated from different sources. *Review Microbiology* **24**, 168-174.
- GASCUN, C.F., RAJAN, L., O'NEILL, E., DOWNEY P., SMYTH, E.G. (2007). Pancreatic abscess due to *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Infection* **54**, 59-60.
- GERVILLA, R., CEPALLAS, M., FERRAGUT, V., GUAMIS, B. (1997a). Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *Journal of Food Protection* **60**, 33-37.

- GERVILLA, R., FELIPE, X., FERRAGUT, V., GUAMIS, B. (1997b). Effect of high hydrostatic pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* strains in ovine milk. *Journal of Dairy Science* **80**, 2297-2303.
- GERVILLA, R., MOR-MUR, M., FERRAGUT, V., GUAMIS, B. (1999a). Kinetics of destruction of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* inoculated into ewe's milk by high hydrostatic pressure. *Food Microbiology* **16**, 173-184.
- GERVILLA, R., SENDRA, E., FERRAGUT, V., GUAMIS, B. (1999b). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* inoculated into ewe's milk to high hydrostatic pressure. *Journal of Dairy Science* **82**, 1099-1107.
- GOODRIDGE, L. D., WILLFORD, J., KALCHAYANAND, N. (2006). Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated onto raw almond by high hydrostatic pressure. *Food Research International* **38**, 408-412.
- GOUAUX, E. Channel-forming toxins: tales of transformation. (1997). *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 566-573.
- GUIMARÃES, M.S., ANDRADE, J.R.C., FREITAS-ALMEIDA, A., FERREIRA, M.C.S. (2002). *Aeromonas hydrophila* vacuolating activity in the CaCo-2 human enterocyte cell line as a putative virulence factor. *FEMS Microbiology Letters* **207**, 127-131.
- HABURCHAK, D.R. (1996). *Aeromonas hydrophila*: An underappreciated danger to fisherman. *Infectious in Medicine* **13**, 893-896.
- HIRONO, I., AOKI, T., ASAO, T., KOZAKI, S. (1992). Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Microbial Pathogenesis* **13**, 433-446.

- HOOVER, D.G., METRICK, C., PAPINEAU, A.M., FARKAS, D.F., KNORR, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food micro-organisms. *Food Technology* **43**, 99-107.
- HUGAS, M., GARRIGA, M., MONFORT, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. In: International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Rome: Università di Parma/ *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, **1**, 85-93.
- KAJIYAMA, N., ISOBE, S., UEMURA, K., NOGUCHI, A. (1995). Changes of soy protein under ultra-high hydraulic pressure. *International Journal of Food Science and Technology* **30**, 147-158.
- KIROV, S.M. (1997). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: DOYLE, M., BEUCHAT, L., MONTVILLE, T. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington DC: *American Society for Microbiology*, pp. 265-287.
- KOSEKI, S., MIZUNO, Y., YAMAMOTO, K. (2008). Use of mild-heat treatment following high-pressure processing to prevent recovery of pressure-injured *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology* **25**, 288-293.
- KUNUGI, S., TANAKA, N. (2002). Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1595**, 329-344.
- LADO, B.H., YOUSEF, A.E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection* **4**, 433-440.

- LAI, C.C., SHIAO, C.C., LU, G.D., DING, L.W. (2007). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: Rare pathogens of infection in a burn patient. *Burns* **33**, 255-257.
- LJUNGH, A., WADSTROM, T. (1982). *Aeromonas* toxins. *Pharmacology & Therapeutics* **15**, 339-354.
- LÓPEZ-FANDIÑO, R., CARRASCOSA, A.V., OLANO, A. (1996). The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *Journal of Dairy Science* **79**, 929-936.
- LULLIEN-PELLERINA, V., BALNYB, C. (2002). High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **3**, 209-221.
- MALONE, A. S., SHELLHAMMER T. H., COURTNEY, P. D. (2002). Effects of High Pressure on the Viability, Morphology, Lysis, and Cell Wall Hydrolase. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4357-4363.
- MARTINS, L.M., CATANI, C.F., FALCÓN, R.M., CARBONELL, G.V., AZZONI, A.A., YANO, T., 2007. Induction of apoptosis in Vero cells by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* vacuolating cytotoxic factor. *FEMS Immunology Medical Microbiology* **49**, 197-204.
- MONIATTE, M., VAN DER GOOT, F.G., BUCKLEY, J.T., PATTUS, F., VAN DORSSELAER, A. (1996). *FEBS Letters* **384**, 269-272.
- MOERMAN, F. (2005). High hydrostatic pressure inactivation of vegetative microorganisms, aerobic and anaerobic spores in pork Marengo, a low acidic particulate

- food product. *Meat Science* **69**, 225-232.
- MOUSSA, M., PERRIER-CORNET, J.M., GERVAIS, P. (2007). Damage in *Escherichia coli* Cells Treated with a Combination of High Hydrostatic Pressure and Subzero Temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6508–6518.
- MUELLER, C.A., BROZ, P., CORNELIS, G.R. (2008). The type III secretion system tip complex and translocon. *Molecular Microbiology* **68**, 1085–1095.
- NEEDS, E. C., STENNING, R. A., GILL, A. L., FERRAGUT, V., RICH, G. T. (2000). High- pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *Journal of Dairy Research* **67**, 31-42.
- OKPALA, C.O.R., PIGGOTT, J.R., SCHASCHKE, C.J. (2010). Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **11**, 61-67.
- ØRMEN, Ø., REGUE, M.Q., TOMA´S, J.M., GRANUM, P.E. (2003). Studies of aerolysin promoters from different *Aeromonas spp.* *Microbial Pathogenesis* **35**, 189-196.
- PADILHA, M. R. F., FERNANDES, Z. F., LEAL, T. C. A., LEAL, N. C., ALMEIDA, A. M. P. (2001). Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **34**, 167-171.
- PALADINI, A.A., WEBER, G. (1981). Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry* **20**, 2587-2593.
- PALUMBO, S., ABEYTA, C., STELMA, G. (2001). *Aeromonas, Acrobacter and Plesiomonas*. In: Downes, F.P., Ito, K. (Eds.), 4th (Ed.), Compendium of Methods for

- the Examination of Foods. *American Public Health Association*, Washington, DC, pp. 283-290.
- PAPAGEORGIOU, D.K., MELAS, D.S., ABRAHIM, A., KOUTSOUMANIS, K. (2003). Growth and survival of *Aeromonas hydrophila* in rice pudding (milk rice) during its storage at 4°C and 12°C. *Food Microbiology* **20**, 385-390.
- PEÑAS, E., FRIAS, J., GOMEZ, R., VIDAL-VALVERDE, C. (2010). High hydrostatic pressure can improve the microbial quality of sauerkraut during storage. *Food Control* **21**, 524-528.
- PFLANZER, S.B., CRUZ, A.G., HATANAKA, C.L., GIGANTE, M.L., SPADOTI, L.M., CRISTIANINI, M. (2008). Review: Effect of high pressure hydrostatic processing on the physical-chemical, microbiology and nutritional features of bovine milk. *Brazilian Journal of Food Technology* **11**, 241-251.
- PIANETTI, A., MANTI, A., BOI, P., CITTERIO, B., SABATINO, L., PAPA, S., ROCCHI, M.B.L., BRUSCOLINI, F. (2008). Determination of viability of *Aeromonas hydrophila* in increasing concentrations of sodium chloride at different temperatures by flow cytometry and plate count technique. *International Journal of Food Microbiology* **127**, 252-260.
- PIVOVAROVA, A.V., MIKHAILOVA, V.V., CHERNIK, I.S. CHEBOTAREVA, N.A., LEVITSKY, D. I., GUSEV, N.B. (2005). Effects of small heat shock proteins on the thermal denaturation and aggregation of F-actin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**, 1548–1553.
- POLLARD, D.R., JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D., ROZEE, K.R. (1990). Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 2477-2481.

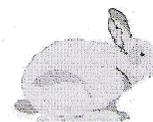
- RITZ, M., THOLOZAN, J.L., FEDERIGHI, M., PILET, M.F. (2001). Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2240-2247.
- RITZ, M., THOLOZAN, J.L., FEDERIGHI, M., PILET, M.F. (2002). Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 47-53.
- ROSE, J.M., HOUSTON, C.W., COPPENHAVER, D.H., DIXON, J.D., KUROSKY, A. (1989). Purification and chemical characterization of cholera toxin cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by human isolated of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity* **57**, 1170-1176.
- SHA, J., PILLAI, L., FADL, A.A., GALINDO, C.L., EROVA, T.E., CHOPRA, A.K. (2005). The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *A. hydrophila*. *Infection and Immunity* **73**, 6446-6457.
- SIERRA, J.C., SUAREZ, G., SHA, J., FOLTZ, S.M., POPOV, V.L., GALINDO, C.L. (2007). Biological characterization of a new type III secretion system effector from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*—Part II. *Microbial Pathogenesis* **43**, 147–160.
- SILVA, J.L., MILES, E.W., WEBER, G. (1986). Pressure dissociation and conformational drift of the beta dimer of tryptophan synthase. *Biochemistry* **25**, 5780-5786.
- SINGH, R., DAR, T.A., AHMAD, S., MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A., AHMAD, F. (2008). A new method for determining the constant-pressure heat capacity change associated with the protein denaturation induced by guanidinium chloride (or urea). *Biophysical Chemistry* **133**, 81-89.

- SINGH, V., SOMVANSHI, P., RATHORE, G., KAPOOR, D. MISHRA, B.N. (2009). Gene cloning, expression and homology modeling of hemolysin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Protein Expression and Purification* **65**, 1-7.
- SMELT, J. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology* **9**, 152-158.
- SPILIMBERGO, S., ELVASSORE, N., BERTUCCO, A. (2002). Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids* **22**, 55-63.
- STYLES, M.F., HOOVER, D.G., FARKAS, D.F. (1991). Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science* **56**, 1404-1407.
- SZCZAWINSKI, J., SZCZAWINSKA, M., STANCZACK, B., FONBERG-BROCZEC, M., ARABAS, J. (1997). Effect of high pressure on survival of *Listeria monocytogenes* in ripened, sliced cheese at ambient temperature. In: HEREMANS, K. (Eds.), High Pressure Research in Biosciences and Biotechnology. Leuven, Belgium: *Leuven University Press*, pp. 295-298.
- THELESMAN, M., LJUNGH, A. (1981). Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of α and β -hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Infectious and Immunity* **34**, 949-956.
- TORRENZAN, R. (2006). Uso da Tecnologia de Alta Pressão para Inativação de Microorganismos em Produtos Cárneos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*.
- TROWER, C.J., ABO, S., MAJEED, K.N., VON ITZSTEIN, M. (2000). Production of an enterotoxin by a gastro-enteritis-associated *Aeromonas* strain. *Journal of Medical Microbiology* **49**, 121-126.

- TRUJILLO, A.J., CAPELLAS, M., SALDO, J., GERVILLA, R., GUAMIS, B. (2002). Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative of Food Science and Emerging Technologies* **3**, 295-307.
- WATSON, I.M., ROBINSON, J.O., BURKE, V., GRACEY, M. (1985). Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors and clinical features. *Journal of Clinical Microbiology* **22**, 48-51.
- WEBER, G., DRICKAMER, H.G. (1983). The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Quarterly Reviews of Biophysics* **16**, 89-112.
- YANG, C.C., SUN, I.F., LIU, C.M., LAI, C.S. (2004). *Aeromonas hydrophila* septicemia in acute hand injury: a case report. *The Kaohsiung Journal of Medical Science* **20**, 351-356.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1880-1, sobre "Estudo dos mecanismos de inativação de *Aeromonas hydrophilia* e seus fatores de virulência por alta pressão hidrostática", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé / Luciano Moura Martins / Ricardo Durães de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 1º. de junho de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1880-1, entitled "Inactivation mechanisms of *Aeromonas hydrophilia* and their virulence factors by high hydrostatic pressure", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 1, 2009.

Campinas, 1º. de junho de 2009.

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício

Fátima Alonso
Secretária Executiva