



ANCELMO RABELO DE SOUZA

**“Tratamento com Alta Pressão Hidrostática combinado com diferentes
condições de temperatura e pH na inativação do
Mycobacterium abscessus”**

Campinas, 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANCELMO RABELO DE SOUZA

**“Tratamento com Alta Pressão Hidrostática combinado com
diferentes condições de temperatura e pH na inativação do
Mycobacterium abscessus”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ancelmo Rabelo de Souza
[Assinatura]
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(a): Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé
Co-Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

So89t	<p>Souza, Anelmo Rabelo de, 1980- Tratamento com alta pressão hidrostática combinado com diferentes condições de temperatura e pH na inativação do <i>Mycobacterium abscessus</i> / Anelmo Rabelo de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador: Carlos Francisco Sampaio Bonafé. Coorientador: Marcelo Lancellotti. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Mycobacterium abscessus</i>. 2. Inativação bacteriana. 3. Alta pressão hidrostática. 4. Inativação por pressão. I. Bonafé, Carlos Francisco Sampaio, 1961-. II. Lancellotti, Marcelo, 1976-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Treatment with high hydrostatic pressure combined with different conditions of temperature and pH on inactivation of *Mycobacterium abscessus*

Palavras-chave em Inglês:

Mycobacterium abscessus

Bacterial inactivation

High hydrostatic pressure

Pressure-induced inactivation

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Francisco Sampaio Bonafé [Orientador]

Marcelo Brocchi

Ligia Ely Morganti Ferreira Dias

Data da defesa: 25-06-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 25 de junho de 2012

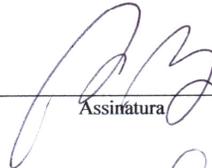
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafe (Orientador)



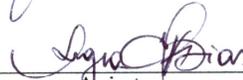
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

Profa. Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias



Assinatura

Profa. Dra. Luciana Maria de Hollanda

Assinatura

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Presto meus agradecimentos a todos que acreditaram no meu trabalho, e acompanharam a minha luta, diante de todas as dificuldades que enfrentei ao longo dessa jornada árdua. Portanto, agradeço especialmente ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, pelo companheirismo, incentivo e por me conduzir com ética e profissionalismo, nesta etapa tão decisiva para minha vida profissional;

Sou muito grato ao meu co-orientador Prof^o. Dr^o. Marcelo Lancellotti, pelos conselhos sempre coerentes e a atenção prestada ao meu trabalho;

Agradeço aos meus pais Manoel Rabelo de Souza e Celina Miranda da Costa, e familiares pelo amor e dedicação que deram a mim. Agradeço especialmente a Zélia Rabelo, minha irmã querida, a quem admiro muito pela generosidade e pelo caráter. Agradeço imensamente a minha companheira Jucilene Leite pelo afeto que tem por mim, aos meus amigos e parceiros de trabalho, Ricardo Durães, Mariana Alcântara, Karina Araujo, Robert Navarro, Rogério Arcuri, Juliana Mattoso, Letícia Prezotto, Fátima Brito, Katia Nascimento, Arinelson Leal, Luis Henrique Tibo, Thiago Oliveira, Fernando Martins, Diomário Cerqueira, Alisom Dropa, Raul Oliveira, Andréia Vigilato;

Tenho muita gratidão à Prof^a. Dr^a. Clarice Arns, pela confiança depositada em mim e pela generosidade;

Ao Prof^o. Dr^o. Paulo Joazeiro, que sempre se prontificou a me ajudar nos momentos de grande necessidade;

À Prof^a. Dr^a. Luciana Hollanda pela amizade e consideração;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Eu tenho a convicção de que todo trabalho de caráter científico é um empreendimento coletivo. Portanto, toda ajuda conseguida será de fundamental importância para construirmos boas relações e grandes feitos para a humanidade.

“Você pode encarar um erro como algo supérfluo a ser esquecido, ou como um resultado que aponta uma nova direção.”

(Steve Jobs)

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	9
2.1. Geral	9
2.2. Específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. <i>Mycobacterium abscessus</i>	10
3.2. Teste de pureza da cepa 2544 do <i>Mycobacterium abscessus</i>	10
3.2.1. Ensaio para produção de catalase à 68°C	10
3.3.2. Ensaio para produção de uréase	11
3.3. Sistema de alta pressão hidrostática	11
3.4. Preparo da suspensão bacteriana para os diferentes ensaios	12
3.4.1. Tratamento com variação de temperatura	12
3.4.2. Tratamento com variação no tempo de exposição	13
3.4.3. Inativação bacteriana por Alta Pressão Hidrostática em diferentes valores de pH	13
3.5. Preparo da cultura celular	14
3.5.1. Ensaio de adesão em células HEP-2 em condições subletais de tratamento	14
3.6. Microscopia eletrônica de varredura	15
3.7. Teste de inativação em tubo de PVC (equipo)	15
3.8. Método para análise estatística	16

4. RESULTADOS	17
4.1. Ensaio de catalase e uréase.....	17
4.2. Inativação bacteriana por APH.....	18
4.3. Inativação do <i>M. abscessus</i> por APH em diferentes pHs.....	20
4.4. Teste de adesão em <i>M. abscessus</i> pós APH em célula HEp-2.....	21
4.5. Microscopia de varredura de <i>M. abscessus</i> tratada com APH.....	24
4.6. Tratamento em APH a 60 °C de amostra contaminada.....	25
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS	36
8. APÊNDICE	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APH	Alta pressão hidrostática
GLP	Glicopeptídeo lipídico
HEp-2	Carcinoma de laringe humano
LAM	Lipoarabinomanose
MCR	Micobactéria de crescimento rápido
MEM	Meio mínimo enriquecido
MNT	Micobactéria não tuberculosa
MPa	Mega Pascal
PBS	Tampão fosfato salina
PVC	Cloreto de polivinila
SFB	Soro fetal bovino
UHT	Tratamento com alta temperatura
UFC	Unidade formadora de colônias

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Diagrama do sistema de APH.....	12
Figura 2. Ensaio de catalase nas temperaturas de 25 °C e 68 °C.....	17
Figura 3. Ensaio de urease.....	18
Figura 4. Inativação do <i>M. abscessus</i> em função do tempo de exposição.....	18
Figura 5. Inativação do <i>M. abscessus</i> em função da temperatura.....	19
Figura 6. Cinética de inativação de <i>M. abscessus</i> por APH em diferentes valores de pH.....	20
Figura 7. Inativação de <i>M. abscessus</i> em tratamento de 45 minutos.....	21
Figura 8. Ensaio de adesão celular de <i>M. abscessus</i> em diferentes tratamentos com APH.....	23
Figura 9. Microscopia de varredura obtida da Figura 5.....	24
Figura 10. Efeito de APH a 60° em fragmento de tubo PVC contaminados por <i>M. abscessus</i>	25
Figura 11. Representação esquemática da parede celular do <i>Mycobacterium</i>	26
Tabelas 1, 2, 3. Valores de UFC/mL obtidos dos experimentos mostrados nas figuras 4 a 6.....	46

RESUMO

Mycobacterium abscessus é um importante patógeno de origem hospitalar que contamina materiais cirúrgicos e biofarmacêuticos. Estes quando mal esterilizados tornam-se agentes infectantes gerando graves patologias nas pessoas que os utilizam. A crescente incidência desse patógeno, as dificuldades de tratamento, a gravidade clínica e, a dificuldade de esterilizar fômites contaminados com este patógeno motivou a investigação de processos alternativos de esterilização. Atualmente, utiliza-se a alta pressão hidrostática como método bastante adequado para reduzir a carga microbiana e esterilizar materiais hospitalares e biofarmacêuticos que são sensíveis à autoclave. Desta forma, investigou-se a inativação de *M. abscessus* induzida por pressão em diferentes condições de temperatura e de pH visando progredir em direção a um método de esterilização. De acordo com os resultados obtidos, tratamentos a 250 MPa não inativaram significativamente (5 a 8 ordens de magnitude) a bactéria em até 90 min a 20°C. Entretanto em -15°C a inativação foi completa. O tratamento a 250 MPa a 60°C por 45 min promoveu significativa inativação bacteriana de até 9 unidades logarítmicas, incluindo o teste com PVC. Além disso, extremos de pH (4 ou 9) também diminuíram acentuadamente o número de bactérias tratados por alta pressão (250 MPa), com inativação completa após 45 min. Assim, este trabalho torna-se de suma importância, uma vez que aponta para o melhoramento de protocolos de descontaminação de fômites hospitalares.

Palavras-chave: *Mycobacterium abscessus*; inativação bacteriana; alta pressão; inativação por pressão.

ABSTRACT

Mycobacterium abscessus is an important hospital-acquired pathogen which induces infections from medical surgical and biopharmaceutical materials. The increasing incidence of this pathogen, the difficulties of treatment and clinical seriousness motivates the investigation of alternatives in sterilization processes. High hydrostatic pressure is a very adequate method for reducing microbial load and for sterilization of hospital materials and biopharmaceutical that are sensitive to autoclaving. We investigated the pressure-induced inactivation of *M. abscessus* combined with different temperatures and pH conditions aiming improvements toward a sterilization methodology. According to our findings, treatment at 250 MPa did not inactivate the bacteria significantly (5 to 8 orders of magnitude) up to 90 min at 20 °C, nevertheless at -15 °C the inactivation was complete. The treatment at 250 MPa and 60 °C or above by 45 min promoted significant bacteria inactivation, at least 9 logarithmic units, including the test PVC. Extremes of pH values (4 or 9) also decrease very much the bacteria number induced by pressure (250 MPa), with complete inactivation at 45 min. The better knowledge of the effect of high hydrostatic pressure in micobacteria may contribute to improvements in the decontamination of medical materials and pharmaceuticals.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*; bacterial inactivation; high pressure; pressure-induced inactivation.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é composto por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que causam a tuberculose no homem e animais, *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase e outras micobactérias não tuberculosas (MNT) (Hinrichsen, 2007).

A infecção por MNT é denominada micobacteriose. Para confirmar se a infecção foi causada por estas bactérias é necessário isolar o patógeno pelo menos três vezes consecutivas a partir de amostras coletadas no sítio de infecção (American Thoracic Society, 1997).

Por muitos anos as infecções por MNT foram subestimadas no Brasil, devido ao desconhecimento dos métodos de isolamento da bactéria e identificação das espécies. Atualmente, os órgãos de saúde pública demonstraram um interesse especial para o isolamento das MNT pelos laboratórios, com manuais explicativos sobre as infecções mais comuns e as formas de isolamento e a capacitação de laboratórios estaduais de referência para identificação das espécies através de técnicas de biologia molecular. Embora diversos casos de infecções por MNT foram relatados no Brasil nos últimos anos, as informações disponíveis na literatura ainda são escassas (Hinrichsen, 2007).

Mycobacterium abscessus é uma MNT que está amplamente distribuída na natureza, sendo isolada do solo, poeira e fontes de água, incluindo piscinas e mar (Katoch, 2004; Acharya, Varshney, 2002). Pertence ao grupo das micobactérias de crescimento rápido (MCR), formando colônias visíveis em meio de cultura Loewenstein-Jensen em cerca de 7 dias de cultivo (Sugimoto *et al.*, 2010). Embora seja encontrada colonizando o homem e

vários animais domésticos, sua transmissão pelo contato direto com animais ou pessoa-a-pessoa é rara. A infecção por estas bactérias ocorrerem principalmente por contaminação ambiental através de ferimentos expostos ou por meio de procedimentos invasivos (Griffith, 2003; Brown-Elliott, Wallace, 2002). De acordo com Le Dantec *et al.*(2002), a relativa resistência de micobactérias relaciona-se a pressões seletivas do ambiente.

Atualmente, os métodos de diagnóstico contribuíram para a identificação do *M. abscessus* em relação às outras micobactérias do seu grupo, isso permitiu destacá-la como importante patógeno humano nos últimos 10 anos, devido à ocorrência de mais casos desta infecção do que por *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum* (Ripoll *et al.*, 2009) .

Um estudo sobre a presença de MNT causando infecções em pacientes do Estado de São Paulo mostrou que *M. abscessus* é a quinta espécie de MNT mais frequente (Ueki *et al.*,2005) . Por outro lado, nos EUA a *M. abscessus* é responsável por mais de 80% dos casos de infecção pulmonar quando comparada com outras micobactérias de crescimento rápido, associando-se a maior taxa de letalidade (Griffith, 2003; Petrini, 2006).

M. abscessus causa infecção pulmonar em humanos, principalmente em pacientes com fibrose cística, nos quais esta bactéria consegue sobreviver no tecido pulmonar, diferentemente de outros patógenos oportunistas do seu grupo, tais como *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium chelonae* que só causam infecção de pele (Medjahed *et al.*,2010). Em pacientes imunocompetentes submetidos a procedimentos invasivos, tais como cirurgias plásticas, *M. abscessus* causa variadas infecções (Newman *et al.*, 2005) tais como, cardíacas (Kessler, 2004), oftalmológicas (Saeed *et al.*,2004), acupuntura e procedimentos de estética incluindo mesoterapia e lipoaspiração (Murillo *et al.*, 2000). Um

caso atípico de endocardite provocado por *M. abscessus* foi atribuído à contaminação de válvula protética pela bactéria; o paciente infectado desenvolveu meningite causada pela mesma bactéria e foi a óbito (Liebeskind *et al.*, 2001).

A infecção por *M. abscessus* também pode acometer pele ou tecido subcutâneo, com reação inflamatória aguda e supuração, ou evolução lenta, com inflamação crônica, formação de nódulos e abscessos, ulceração e fistulização (Hinrichsen, 2007). Apresenta sinais e sintomas locais como dor, vermelhidão, febre, evoluindo para a drenagem de secreção e deiscência de sutura (Katoch, 2004).

A forma mais frequente da doença é crônico-progressiva, e a suspeita clínica é dada geralmente devido à falta de resposta aos antibióticos mais utilizados no tratamento de infecções da pele (Hinrichsen, 2007), pois é um dos MNT mais resistentes a antibióticos tornando o tratamento difícil, prolongado, com frequentes casos de falhas e recidivas, sendo muitas vezes necessária a associação de abordagem cirúrgica (Brown-Elliott, Wallace Jr, 2002).

O patógeno também apresenta resistência à maioria dos desinfetantes e biocidas, se adaptando às condições ambientais mais adversas. Esta propriedade é consequência da presença de uma parede celular composta por alto conteúdo lipídico (ácido micólico), que atua como barreira de proteção frente a agentes químicos (Ripoll *et al.*, 2009; Bello *et al.*, 2006).

M. abscessus é resistente aos antibióticos considerados de primeira escolha no tratamento de *M. tuberculosis*, tais como isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e apresentando sensibilidade *in vitro* à amicacina, cefoxitina e claritromicina. Entretanto, *in vivo*, esses antibióticos apresentam eficácia questionável (Huang *et al.*, 2010). Outros

antibióticos como tetraciclina, fluoquinolonas e sulfonamidas, são utilizados para distinguir fenotipicamente *M. abscessus* que é resistente a esses antibióticos enquanto *M. chelonae* é sensível (Petrini, 2006).

Embora as infecções por *M. abscessus* tornaram-se importantes nas últimas décadas, devido a todas as características acima descritas, os fatores envolvidos na sua virulência ainda são pouco conhecidos. Até o presente momento, sabe-se que a produção das enzimas catalase e uréase e a capacidade de invasão em células epiteliais, consideradas fatores de virulência em diferentes espécies bacterianas também foram descritas para *M. abscessus* (Levy-Frebault *et al.*, 1983).

Além disso, as diferenças no aspecto morfológico das colônias de *M. abscessus* também indicam maior ou menor virulência. Estudos clínicos demonstraram que a forma rugosa apresenta maior virulência, quando comparada com a cepa morfolologicamente lisa (Julian *et al.*, 2010). Tais colônias lisas possuem em sua parede celular vasto conteúdo lipídico e glicopeptídico (GPL) (Howard *et al.*, 2006) e a presença ou ausência destes componentes também relaciona-se ao potencial virulento deste patógeno. Sendo assim, a ausência do GPL aumenta a virulência desta bactéria embora, o mecanismo que modula os níveis de produção de GPL ainda seja desconhecido (Gokhale *et al.*, 2007).

Existem diversos relatos de infecções por *M. abscessus* em diferentes partes do mundo demonstrando que a esterilização inadequada de equipamentos médicos e diferentes soluções contaminadas (soluções para assepsia, medicamentos injetáveis, anestésicos e soluções usadas em procedimentos de lipoescultura) são importantes fontes de infecção deste patógeno (Murillo *et al.*, 2000; Bigata *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2004).

Na indústria são utilizados atualmente diferentes métodos para esterilizar produtos

farmacêuticos, alimentares e de aplicação biomédica. Tratamentos térmicos, tais como a “ultra high temperature” (UHT) são os mais empregados, promovendo a total inativação de microrganismos, principalmente devido a danos irreversíveis nas estruturas da célula bacteriana. Algumas das desvantagens apresentadas pela alta temperatura empregada (acima de 145 °C) são: desnaturação de algumas proteínas, hidrólise de vitaminas, produção de compostos tóxicos e características organolépticas indesejáveis (Spilimbergo *et al.*, 2002) .

Outros processos físicos e químicos são usados na desinfecção e esterilização de produtos de uso hospitalar, principalmente quando os materiais a serem tratados são sensíveis a altas temperaturas, recomendando-se nestes casos a utilização de técnicas que usam temperaturas médias e baixas, tais como, vaporização por peróxido de hidrogênio, óxido de etileno, ozônio, vapor de ácido peracético, radiação ionizante e pulso de luz (Rutala *et al.*, 1998). Nesse contexto a técnica de alta pressão hidrostática (APH) foi inicialmente aplicada na década de 90 no Japão, na indústria de alimentos para preservação de alimentos processados (Fonberg-Broczek *et al.*, 2005).

Na indústria de alimentos, o processo de esterilização ou pasteurização por APH é considerado um método físico potencialmente seguro, que preserva as propriedades nutricionais, aroma e sabor dos alimentos (Smelt, 1998; Moerman, 2005).

Vale a pena destacar que, a APH atua rompendo as ligações secundárias e terciárias de proteínas, não afeta em geral as ligações covalentes, nem deteriora as vitaminas essenciais e os compostos aromáticos (Moerman, 2005). Essa técnica vai de encontro à grande procura de alimentos mais frescos, minimamente manipulados, livres de aditivos e conservantes (Fonberg-Broczek *et al.*, 2005).

De acordo com Rivalain *et al.*(2010), existem diferentes tipos de pressão que são

usadas no meio tecnológico, entre elas destaca-se, a estática (mantida por um longo período) e a dinâmica (mantida por curtos períodos). A pressão estática é dividida em duas categorias:

- Pressão isostática, onde a pressão é a mesma em todas as direções do espaço, este fenômeno ocorre especialmente com fluidos de baixa compressibilidade como a água, etanol (pressão hidrostática).
- Pressão não-isostática, onde a pressão ocorre mediante a estrutura do equipamento ou devido à compressibilidade não homogênea do meio, particularmente em sólidos com uma estrutura anisotrópica.

A aplicação da APH na indústria médica e farmacêutica também fora pesquisada na preservação de biofármacos, derivados de sangue, células e órgãos para transplante, sendo uma técnica promissora para o futuro próximo (Masson *et al.*, 2001). Isso porque, quando comparado com nitrogênio líquido em pressão atmosférica, menos danos estruturais são observados para produtos conservados à baixa temperatura com o auxílio da APH. As propriedades da água sob pressão permitem que bioprodutos sejam armazenados em temperaturas abaixo de zero sem congelamento, evitando efeitos prejudiciais do processo de congelamento e descongelamento. Assim, produtos biofarmacêuticos frágeis são esfriados a temperaturas negativas sem sofrerem danos. Além disso, utiliza-se a ação combinada de APH e calor moderado para a esterilização de produtos sensíveis à temperatura, como lipossomos, cosméticos e pequenos instrumentos cirúrgicos (Rivalain *et al.*, 2010; Rutala *et al.*, 1998).

A APH é capaz de inativar uma grande variedade de microrganismos, no entanto, a sua eficiência depende de diferentes fatores tais como, à espécie de microrganismo, à

morfologia das células, fase de crescimento entre outros, por exemplo, os bacilos tendem a ser mais sensíveis que os cocos, isso pode estar relacionado a constituição da parede, os esporos são mais resistentes do que as formas vegetativas das bactérias, e na fase de crescimento exponencial as bactérias são mais sensíveis ao tratamento com alta pressão (Spilimbergo *et al.*, 2002; Fonberg-Broczek *et al.*, 2005; Hugas *et al.*, 2002). Muitas vezes são necessárias combinações de tratamento com APH e temperaturas negativas ou acima de 50 °C para conseguir uma inativação efetiva (Lavinhas *et al.*, 2007; Hashizume *et al.*, 1995). Em relação ao mecanismo de ação, a APH pode inativar enzimas chaves na multiplicação dos micro-organismos, modificações na membrana com alteração de interações hidrofóbicas, alterações em lipídeos ou inibir a síntese proteica (Abe *et al.*, 1999).

Cléry-Barraud e colaboradores (2004) mostraram que esporos de *Bacillus anthracis* são inativados por combinação de alta pressão hidrostática e calor (500 MPa a 75 °C por 4 min.). Esses resultados mostram a importância da alta pressão para esterilização, mesmo porque esses esporos são altamente resistentes aos tratamentos térmicos convencionais, irradiação, dessecação e desinfetantes. É interessante observar que as células bacterianas que sofreram determinado tipo de estresse como aquecimento subletal ou choque a frio podem apresentar maior resistência a pressão (Torrezan, 2003).

De acordo com Gollwitzer e colaboradores (2009) o tratamento feito com pressão de 300 MPa a 4° C por 30 min. foi capaz de esterilizar dispositivos cirúrgicos como parafusos ortopédicos contaminados com *Staphylococcus aureus*. Outro estudo feito por Diehl e colaboradores (2005) mostrou que as principais proteínas presentes em tecidos ósseos (fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I) não foram alterados depois do tratamento com APH a 600 MPa, mas poderiam ser afetadas pelos processos de esterilização convencionais

como autoclavagem, irradiação e agentes químicos. Portanto, a APH é vista como uma técnica interessante para tratar enxertos como ossos, tendões, ligamentos, cartilagens, garantindo a integridade destes tecidos (Nall *et al.*, 2008).

A APH tem um grande potencial de aplicação, porque mostra um equilíbrio bastante sutil no seu efeito desejado entre causar a inativação de micro-organismos patogênicos e a preservação de propriedades específicas de determinados produtos (Rivalain *et al.*, 2010).

Uma forma de aumentar a eficiência da APH seria modificar o pH do meio de tratamento para tratar materiais médico-cirúrgicos. APH favorece a associação de ácidos fracos, tendendo ao desequilíbrio no pH intracelular com o aumento de prótons no citoplasma levando a perda das funções e morte celular (Molina-Gutierrez *et al.*, 2002).

De modo geral, a associação de fatores físicos e/ou químicos no tratamento com APH leva a inativação muito expressiva de micro-organismos de pelo menos 8 ordens de magnitude, viabilizando essa metodologia para esterilização em níveis de segurança mais elevados, como mostrado no presente trabalho, melhorando os protocolos de esterilização de fômites contaminados por microbactéria e desta forma, impedindo novos casos de infecção hospitalar por este patógeno.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar as condições de tratamento e medir a eficiência no processo de esterilização que inativam *M. abscessus* por APH.

2.2. Específicos

Determinar a cinética de inativação de *M. abscessus* com base nos parâmetros físico-químicos (temperatura, pressão, pH);

Observar se a alta pressão em condições subletais interfere na capacidade de adesão de *M. abscessus* em células HEp-2;

Identificar as alterações morfológicas de *M. abscessus* sob APH;

Observar se a 250 MPa, 60 °C por 45 min é capaz de tratar material de PVC contaminado com alta carga de *M. abscessus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Mycobacterium abscessus*

O trabalho foi desenvolvido utilizando uma cepa de *Mycobacterium abscessus* isolada de secreção de abscesso cutâneo, denominada ATCC 2544. A bactéria foi identificada pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL/SP) e faz parte da coleção de cultura do IAL/Regional de Campinas. Um repique desta linhagem foi gentilmente doado para a realização deste trabalho pela pesquisadora Dra. Gleize Carbonell.

3.2. Teste de pureza da cepa 2544 do *Mycobacterium abscessus*

A bactéria foi descongelada e semeada em meio Middlebrook 7H11 (Difco) e Löwenstein-Jensen, para isolamento das colônias e verificação da pureza das culturas, com observação das características dessa espécie, o tipo da colônia (lisa ou rugosa), pigmentação amarela clara, com tempo de crescimento que varia de 3 a 7 dias, dependendo do meio de cultura usado (Julian *et al.*, 2010).

3.2.1. Ensaio para produção de catalase à 25 °C e 68 °C

Foram inoculados dois tubos contendo 1,0 mL de tampão fosfato (pH 7,0) com uma alçada de crescimento da bactéria. Um dos tubos foi incubado em banho-maria a 68 °C e o outro à temperatura ambiente. Após 20 min de incubação, foram adicionados aos tubos 0,5 mL da solução reveladora (volumes iguais de Tween 80 10% e H₂O₂ 30%). O teste é considerado positivo pela formação de bolhas à temperatura ambiente e à 68 °C (Levy-Frebault *et al.*, 1998).

3.3.2. Ensaio para produção de urease

A hidrólise da uréia foi verificada utilizando meio Bacto Uréia Base (Difco) que possui vermelho de fenol, conhecido como indicador colorimétrico de pH, em sua composição. A bactéria foi inoculada neste meio, e o mesmo foi incubado de 3 a 5 dias a 37 °C. A reação positiva foi identificada através da variação colorimétrica do meio de cultura de alaranjado para vermelho. Esta variação colorimétrica indica que, a bactéria produz urease que catalisa a reação que converte uréia em amônia. Esta torna o pH do meio básico alterando sua cor como antes citado (Levy-Frebault *et al.*, 1998).

3.3. Sistema de alta pressão hidrostática

O sistema utilizado consiste de uma câmara de alta pressão. No interior desta câmara foram colocados sacos estéreis (PolySilk[®], França) com volume aproximado de 1,5 mL, da amostra a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão, os sacos foram selados em alta temperatura com um selador elétrico (BARBI[®] M 300T, Brasil). O fechamento dos sacos permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra do saco, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos (Wuytack *et al.*, 2002).

A Figura 1 mostra um esquema do sistema de alta pressão. A unidade geradora de pressão é constituída por um pistão (HPI M # 37-5.75-60, EUA) operado através de um motor, que injeta etanol absoluto por dutos metálicos até a câmara. A medida de pressão é realizada através de manômetro analógico (Paladini, 1981).

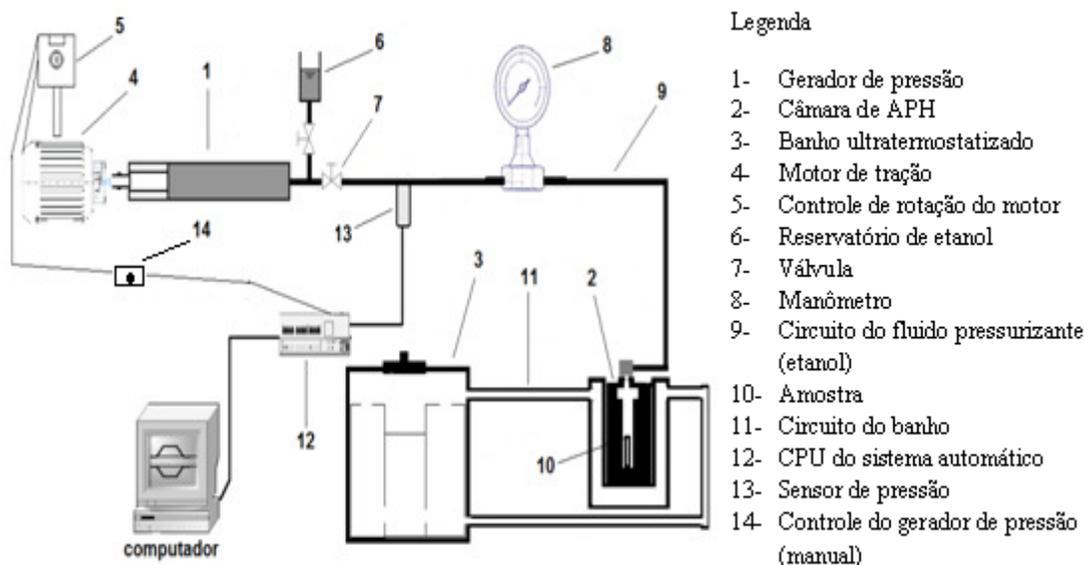


Figura 1- Diagrama do sistema de APH

3.4. Preparo da suspensão bacteriana para os diferentes ensaios

As colônias de *M. abscessus* foram transferidas para o meio líquido Mueller Hinton e incubadas a 37 °C por 120 h. Após a incubação, a cultura foi centrifugada (4.000 x g, 15 min), lavada com solução salina estéril (NaCl 0,9%), e o precipitado foi suspenso no mesmo tampão, ajustando a concentração de bactérias para 1×10^8 UFC/mL pela escala de Macfarland (1907) . Para cada tratamento com alta pressão, foram utilizados 1,5 mL da suspensão bacteriana. Procedeu-se em seguida as diluições seriadas 1:10 em solução salina 0,9%, pH 7,4 esterilizada e subsequente plaqueamento em Agar Mueller Hinton e incubação a 37 °C por 5 dias, para contagem das colônias de bactérias em UFC/mL.

3.4.1. Tratamento com variação de temperatura

A amostra foi submetida a uma pressão de 250 MPa por 45 min, nas temperaturas -15 °C até 70 °C. O controle da temperatura no interior da câmara foi mantido

através do sistema de banho ultratermostatizado (Marconi® MA184), o qual está conectado à câmara através de dutos. Antes de iniciar os ensaios com cada temperatura se aferia com termômetro a temperatura no interior da câmara para garantir a padronização das condições experimentais. O tempo de compressão e descompressão das amostras era de 2 min e 30 s.

3.4.2. Tratamento com variação no tempo de exposição

As amostras foram submetidas à pressão de 250 MPa por diversos tempos, até 90 min, em temperaturas de 20 °C e -15 °C, de modo semelhante ao realizado por Gollwitzer *et al.*(2009).

3.4.3. Inativação bacteriana por APH em diferentes valores de pH

Foi feito um inóculo de *M. abscessus* em caldo Müller Hinton (Difco), 7,5 mL, o qual foi incubado por 120 h, após este tempo centrifugou-se o inóculo a 4000g por 15 min em centrífuga (Fanem® 206R). O sobrenadante foi descartado, e os precipitados bacterianos foram suspensos em diferentes tampões da seguinte maneira: de pH 3 até 6, foi utilizado tampão citrato (Acebra) (0,125 M), sendo que para as amostras pressurizadas foi utilizada 0,4 unidade de pH acima das amostras controle, pois a alta pressão leva a uma queda de pH nesse valor, ao contrário de tampão bis-tris-propano, que sofrem variações desprezíveis (Neuman *et al.*, 1973). Para os valores de pH de 7,4 até 9,4, utilizou-se 0,125 M de tampão bis-tris-propano.

As suspensões bacterianas foram ajustadas na concentração 1×10^8 UFC/mL pela escala de Macfarland (1907). Utilizou-se os tempos de exposição a 250 MPa de 15, 30 e 45 min em cada condição de pH, com os respectivos controles à pressão atmosférica. Em seguida, procedeu-se as diluições seriadas 1:10 em solução salina 0,9% estéril, pH 7, e

subsequente plaqueamento e incubação a 37 °C por 5 dias, para contagem das colônias de bactérias em UFC/mL.

3.5. Preparo da cultura celular

As células HEp-2 (carcinoma de laringe humano) foram obtidas do Laboratório de Virologia do Departamento de Genética, Evolução e Biagentes, IB, UNICAMP, as quais foram rapidamente descongeladas e transferidas para frascos contendo meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Gibco BRL, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell) e solução de antibióticos (1.000 UI/ml de penicilina e 250 µg/ml de estreptomicina) (Sigma Chemical Co). As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. Após a formação de monocamada confluenta, 10⁴ células/ml, estas foram tripsinizadas, contadas, distribuídas em placas de 24 orifícios e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas e, em seguida, foram utilizadas para os ensaios biológicos.

3.5.1. Ensaios de adesão em células HEp-2 em condições subletais de tratamento

Para observar se o tratamento com pressão induzia mudança na capacidade de adesão bacteriana na célula, foram realizados ensaios de adesão com a bactéria não tratada com pressão e com aquelas submetidas a condições subletais de tratamento.

O teste de adesão em células foi baseado na metodologia descrita por Scaletsky *et al.*(1984) com modificações. Para a realização do mesmo, 50 µL de uma suspensão bacteriana contendo 1x10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) foi adicionada a cada poço contendo 1 mL de meio mínimo enriquecido (MEM) suplementado com 10 % de SFB. As células foram incubadas por adicional período de 2 h. Após a incubação, as células

foram lavadas 6 vezes com PBS e posteriormente corados com eosina-azul de metileno. Para determinar o número de UFC de *M. abscessus* utilizados em cada teste de adesão, um volume também de 50 µL foi plaqueado em placas de ágar Müller Hinton a 37 °C por 5 dias.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura

As cepa 2544 do *Mycobacterium abscessus* foram submetidas à APH nas temperaturas de 50 °C e 60 °C durante um tempo de 45 min, e em seguida o material foi filtrado (Millipore 0,22 µm) e fixado no próprio filtro com glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante 2 h e lavado rapidamente com tampão PBS 0,1 M. Os espécimes bacterianos foram então expostos a 1 % de tetróxido de ósmio (OsO₄) no mesmo tampão por 1h. Em seguida foi realizada uma desidratação progressiva em gradiente alcoólico (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 3 x 100 %), sendo as amostras submetidas a secagem em equipamento de ponto crítico (“Critical Point”. Balzers, CPD 0300). Os espécimes foram acoplados sobre *stubs* para se proceder o banho de ouro (“Sputter. Balzers, SCD 050) (Battistelli *et al.*, 2005) . Utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura JEOL, JSM 5800 LV (Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp).

3.7. Teste de inativação em tubo de PVC (equipo)

Foram utilizados três fragmentos de 1 cm de tubo PVC esterilizado, previamente cortados em condições estéreis. Os fragmentos foram introduzidos em frasco de vidro de 20 mL contendo caldo Mueller Hinton recém inoculado com *Mycobacterium abscessus* na concentração de 10⁸ UFC/mL ajustada pela escala de Mac Farland. Após cinco dias um dos fragmentos de PVC foi retirado do meio de cultura e lavado em água destilada e,

posteriormente selado em embalagem de polietileno, contendo solução salina 0,9 %. Todos os componentes deste experimento foram previamente esterelizados. A amostra foi tratada com APH por 45 min a 60 °C. Utilizou-se como controle um fragmento contaminado, lavado e selado de modo semelhante à amostra, e tratado à APH a 60 °C por 45 min. Os fragmentos de PVC foram retirados em condições estéreis e imersos em tubos de ensaio distintos contendo caldo Mueller Hinton, para observar o possível crescimento bacteriano, após 5 dias fez-se plaqueamento com diluição seriada 1:10 e quantificação das colônias. Finalmente, o terceiro fragmento contaminado e incubado por cinco dias em caldo Müeller Hinton foi retirado do mesmo, lavado em água destilada estéril e corado com violeta genciana. Para o controle negativo foi usado um fragmento de PVC externo tratado em condições estéreis e corado com o violeta genciana, conforme Carter *et al.* (2003) , com modificações.

3.8. Método para análise estatística

Os dados foram submetidos a uma análise estatística de variância usando o programa Origin Pro 8 na função “one-way-ANOVA”, para testar a correlação entre inativação e o tempo de tratamento nas diferentes condições de temperatura mostradas nas Figuras 4 e 5.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de catalase e urease

Para caracterização da cepa foi realizado o ensaio de catalase nas temperaturas de 68 °C e 25 °C. A Figura 2 mostra a formação de inúmeras bolhas, indicando que a cepa é catalase positivo. Ocorre decomposição de peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio pela enzima bacteriana catalase.



Figura 2- Ensaio de catalase nas temperaturas de 25 °C e 68 C°.

Outra caracterização feita foi o ensaio de urease, enzima presente. A cepa apresentou positividade neste teste, evidenciada pela mudança de cor consequente à degradação de uréia e formação de amônia, e assim variação de pH, (Figura 3B).

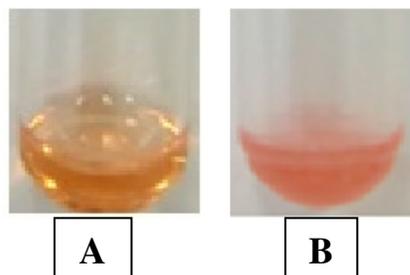


Figura 3- Ensaio de urease. (A) Controle negativo de cor alaranjada, (B) Amostra 2544.

4.2. Inativação bacteriana por APH

A cinética de inativação do *M. abscessus* foi estudada em APH com temperaturas de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e variação de tempo de 0 a 90 min, pH 7,4. Na Figura 4 foi observado que no tempo de 90 minutos a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ com exposição de APH não foi encontrado crescimento bacteriano, sendo este resultado significativo ($p < 0,05$). No mesmo tempo, sob a mesma exposição de APH e com temperatura a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a CFU caiu de $(1,8 \times 10^8)$ para $(3,9 \times 10^6)$ sendo a inativação de 2 ordens de magnitude aproximadamente.

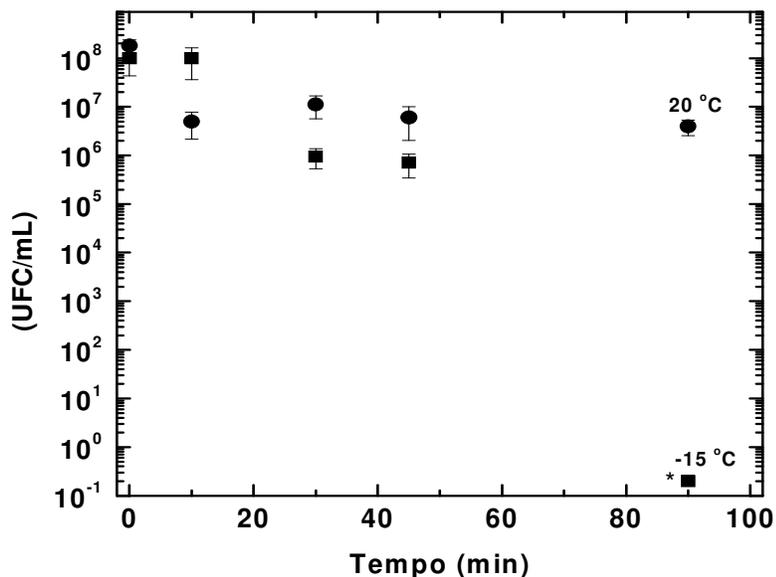


Figura 4- Inativação do *M. abscessus* em função do tempo de exposição à APH (250 MPa) a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7,4. Os dados foram colhidos com três experimentos independentes, sendo as barras correspondentes aos desvios-padrão. (*): bactérias não detectadas. A $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,05$) para tempo-dependência. Estes dados constam na Tabela 1 (página 46)

Esses resultados demonstraram a grande diferença entre as duas condições de temperatura na inativação desta bactéria por APH. Sendo assim, realizou-se um estudo mais detalhado do efeito da temperatura e da APH na inativação do *M. abscessus* com o tempo de 45 minutos de tratamento (Figura 5). Esse tempo foi escolhido por ser adequado para um eventual processo de esterilização em procedimentos de rotina. À PA (pressão atmosférica), nas diferentes temperaturas de -15 °C até 70 °C foi observado crescimento bacteriano. Por outro lado, à APH ocorreu inativação de cerca de 2 ordens de magnitude entre -15 °C e 40 °C. Todavia, com o aumento da temperatura acima de 40 °C ocorreu expressiva morte bacteriana, não se observando colônias bacterianas a partir de 60 °C.

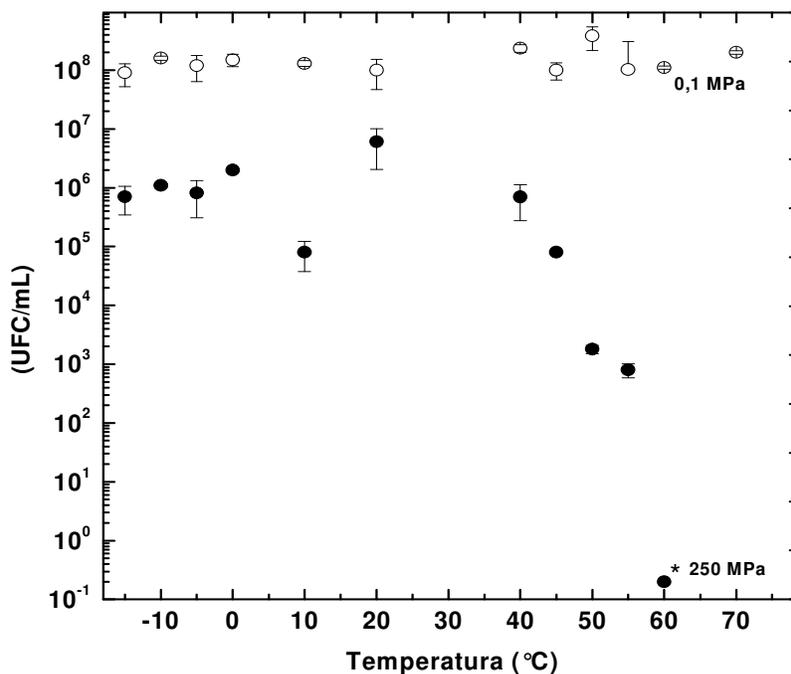


Figura 5- Inativação do *M. abscessus* em função da temperatura, com 45 min de tratamento, com 0,1 MPa e 250 MPa a pH 7,4. Os dados foram colhidos com três experimentos independentes, sendo as barras correspondentes aos desvios-padrão. (*): bactérias não detectadas. A inativação a APH foi significativa ($P < 0,05$). Estes dados constam na Tabela 2 (página 46)

4.3. Inativação do *M. abscessus* por APH em diferentes pHs

Buscando outras condições de inativação de *M. abscessus*, foi estudado o efeito de APH em diferentes valores de pH, como mostra a Figura 6. Observou-se uma grande sensibilidade para inativação da bactéria à APH em pHs mais ácidos e mais alcalinos nos tempos de tratamento entre 15 e 45 min. Em pH 3,0 morte bacteriana em PA e em APH (dados mostrados na Figura 7).

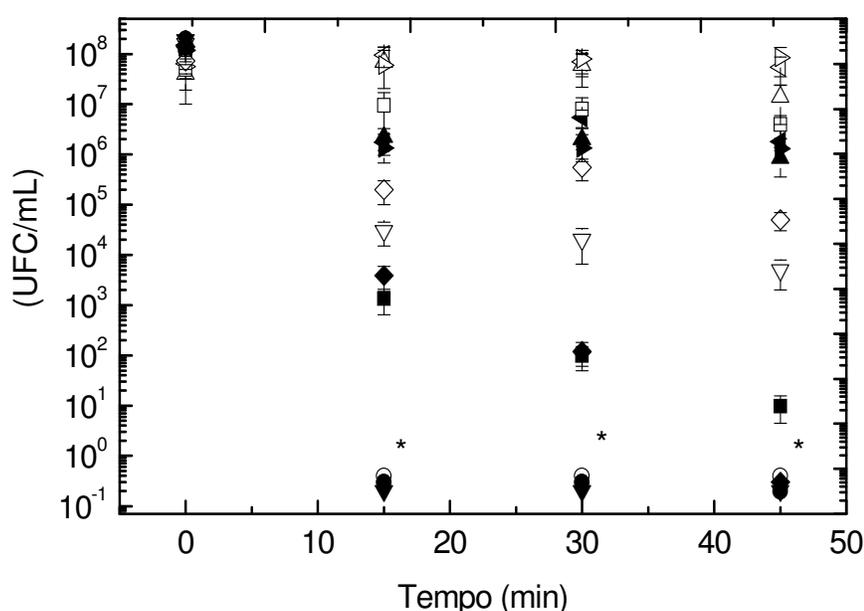


Figura 6- Cinética de inativação de *M. abscessus* por APH em diferentes valores de pH. Símbolos abertos: PA (○ pH 3, ▽ 4, ◁ 5, △ 6, ▷ 7, □ 8, ◇ 9), símbolos fechados: amostras à APH, temperatura de 25 °C (pH ● 3.4, ▼ 4.4, ◀ 5.4, ▲ 6.4, ▶ 7, ■ 8, ◆ 9). Utilizou-se uma concentração de 1×10^8 UFC/mL (escala de Mac Farland) para cada ponto experimental. Cada símbolo representa a média dos resultados feitos com três experimentos independentes, as barras correspondem aos desvios-padrão. (*) bactérias não detectadas. Estes dados constam na Tabela 3 (página 47)

A Figura 7, mostra a inativação de *M. abscessus* em “extremos” pHs à pressão atmosférica, sendo que a APH potencializa essa inativação. Num período de tratamento de 45 min, observou-se que a alta pressão teve menor efeito entre valores de pH 5,0 a 7,0, com

redução máxima de 3 ordens de magnitude. Essa inativação foi independente do tempo de exposição à APH, pois foi parecida com a obtida em tempo de incubação de 15 e 30 min nos respectivos valores de pH, (Figura 6). Esse comportamento foi semelhante ao mostrado na Figura 4, na temperatura de 20 °C, onde também não se observou expressivo aumento de inativação da bactéria por APH com o tempo. Os experimentos com a variável pH foram feitos a 25 °C para garantir a eficiência dos tampões nas diferentes faixas estudadas.

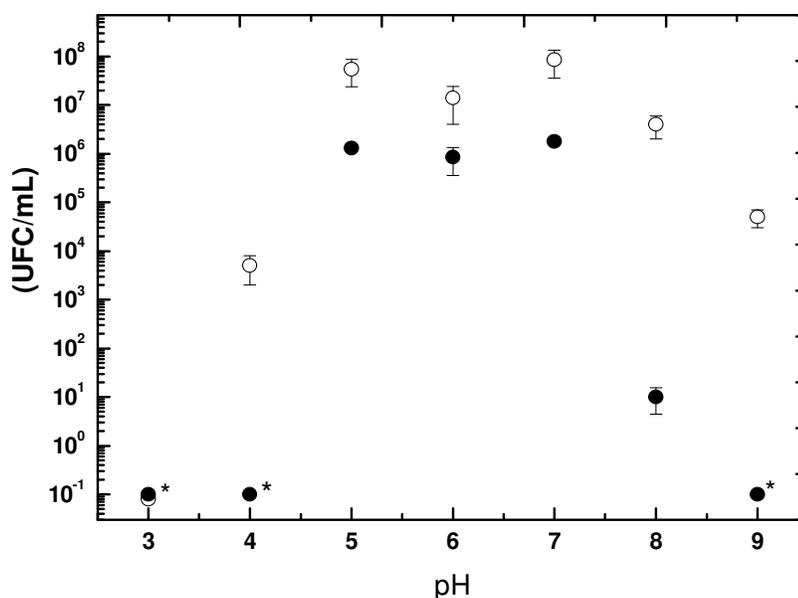


Figura 7- Inativação de *M. abscessus* em tratamento de 45 min, com variação de pH a PA (○) e APH (●). (*): bactérias não detectadas.

4.4. Teste de adesão do *M. abscessus* pós APH em célula HEp-2

Foi verificada a capacidade de adesão do *M. abscessus*, e com isso a viabilidade desta amostra, para infectar células após tratamento com APH em condição subletal (20 °C a APH e PA), (Figura 4), utilizando células HEp-2. No controle negativo (Figura 8A), sem adição de bactérias, observamos a organização celular com a morfologia bem definida e

característica das células HEp-2. As células infectadas com *M. abscessus*, mantiveram as mesmas características iniciais. Na Figura (8B), células HEp-2 infectadas com bactérias tratadas em condições subletais (250 MPa, 20 °C, 45 min), observa-se presença de bactérias aderidas nestas células (setas), com uma presença esporádica. A Figura 8C, células infectadas com bactérias tratadas a PA a 20 °C em 45 min mostrou semelhança ao observado na Figura 8B, portanto as células infectadas com *M. abscessus* tratado em alta pressão não diferem do respectivo controle (bactérias sem tratamento por APH).

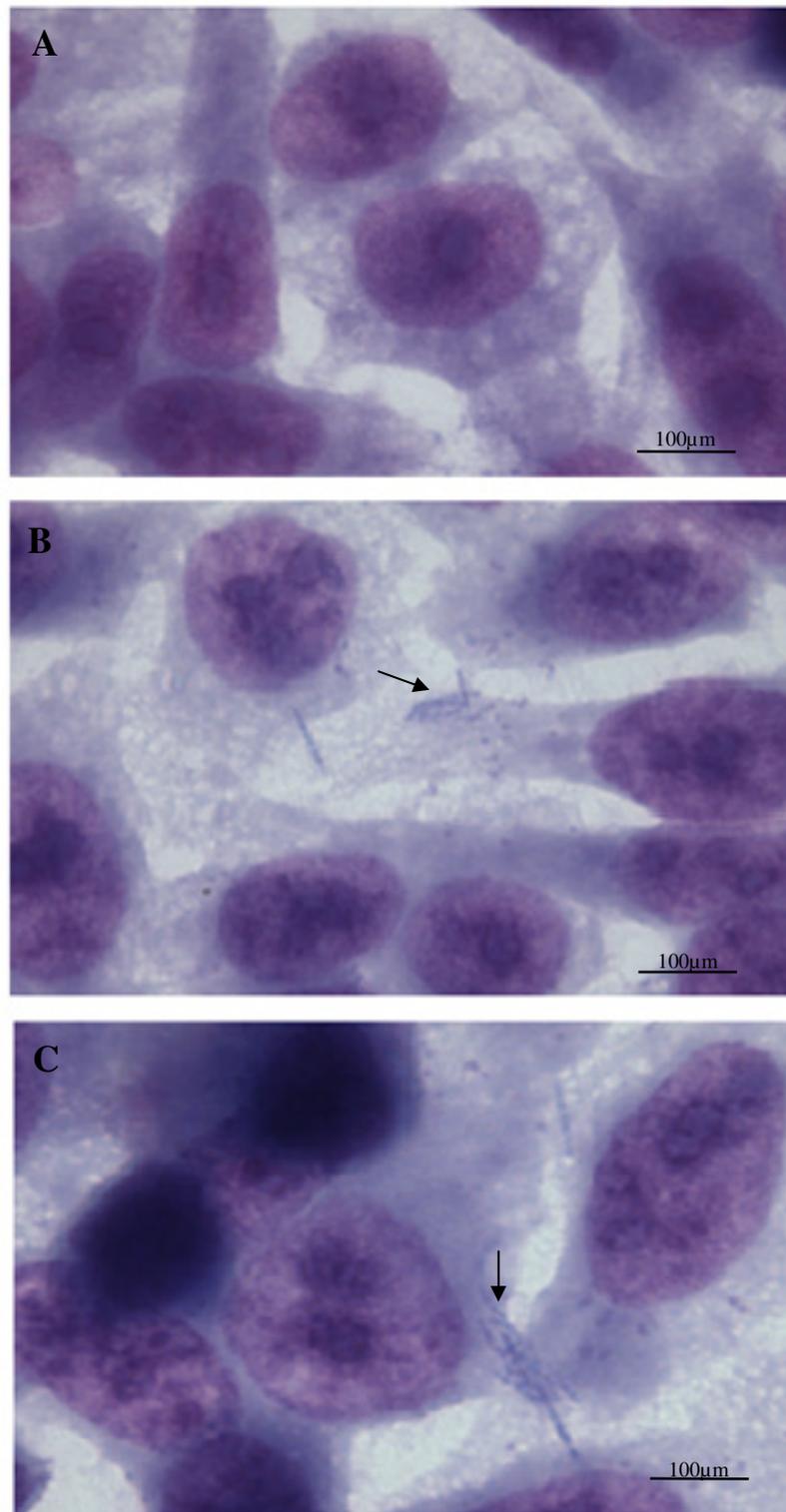


Figura 8 – Ensaio de adesão do *M. abscessus* com tratamento subletal em APH em células HEp-2. (A): Células não infectadas (controle negativo), (aumento 1000x); (B): Células infectadas com *M. abscessus* tratado a 20 °C por 45 min a APH. (aumento 1000x); (C): Células infectadas com *M. abscessus* tratado com 20 °C por 45 min a PA, (aumento 1000x).

4.5. Microscopia de varredura do *M. abscessus* tratado com APH

Para verificar a existência de possíveis mudanças estruturais do *M. abscessus* correlacionadas com o tratamento em APH em diferentes temperaturas, fez-se a microscopia eletrônica de varredura das bactérias nas condições de 50 °C e 60 °C a 250 MPa e 0,1 MPa, ambas com 45 min. Tais condições foram escolhidas, porque houve uma inativação expressiva do *M. abscessus*, (Figura 5). Foram observadas bactérias exibindo alterações estruturais como: fragmentação (setas 1 e 3, Figura 9B e seta 6, Figura 9D), fissuras (seta 4, Figura 9D) e alongamento (seta 5, Figura 9D), sugerindo que a alta pressão em alta temperatura induzem alterações morfológicas detectáveis.

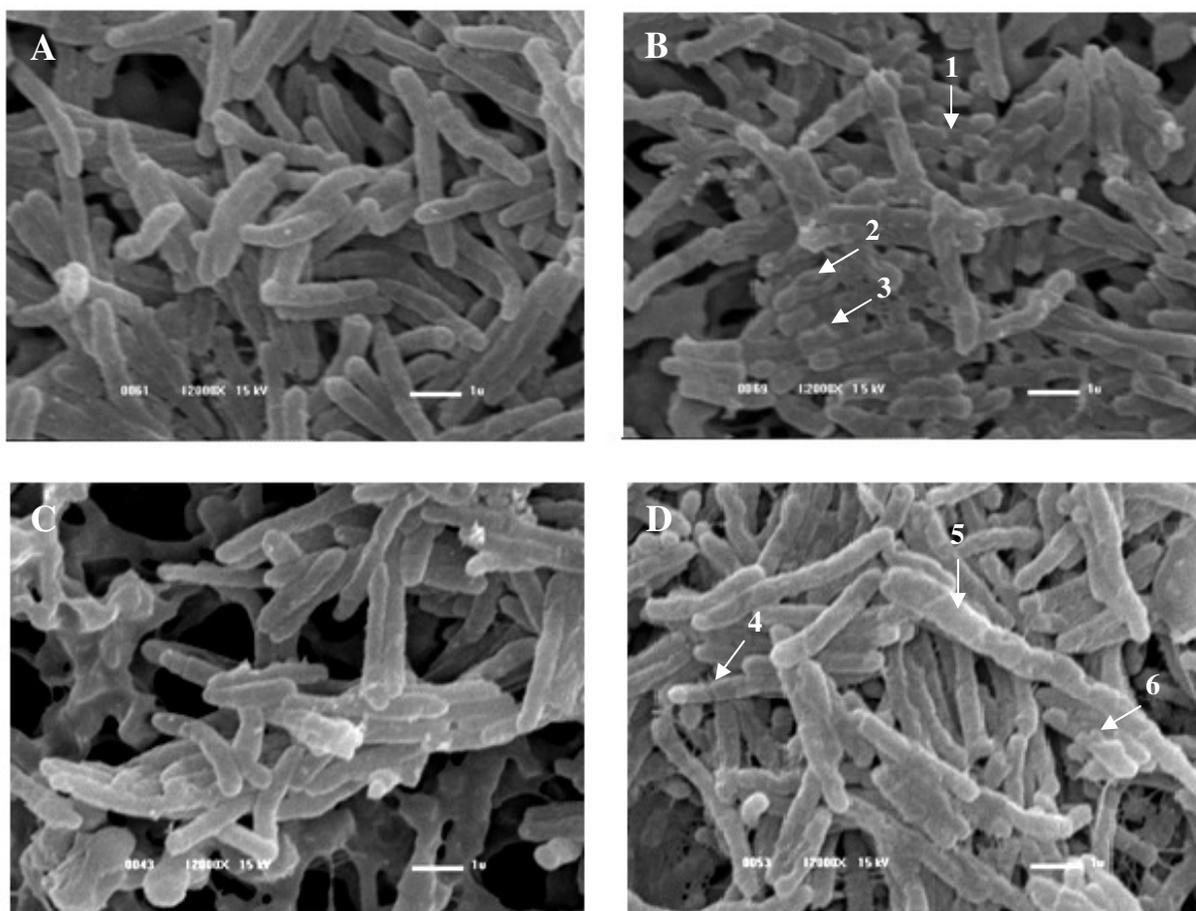


Figura 9- Microscopia de varredura, nas mesmas condições de tratamento mostradas na Figura 5 em (A): Controle 50 °C, 45 min, (B): 250 MPa, 50 °C, 45 min, (C): Controle a 60 °C, 45 min, e (D): 250 MPa, 60 °C, 45 min.

4.6. Tratamento em APH a 60 °C de amostra contaminada

Como vimos, a inativação por alta pressão de *M. abscessus* à 60 °C foi demonstrada na suspensão bacteriana. Um exemplo de aplicação dessas condições para inativação da bactéria em material hospitalar é mostrada na Figura 10. Observa-se a evidente presença de contaminação no meio, (Figura 10), assim como a presença de bactérias junto à superfície do material, mostrada por violeta genciana, (Figura 10B). A Figura 10E mostra que subsequente tratamento com APH 250 MPa a 60 °C, por 45 min. da amostra contaminada promoveu inativação total das bactérias, pois cinco dias após o tratamento com APH não se observou contaminação do meio. Confirmou-se tal inativação com a semeadura do meio relacionado à (Figura 10E) em novo meio de cultura, não se observando crescimento bacteriano. A amostra tratada a 60 °C, por 45 min. à pressão atmosférica apresentou contaminação evidente, (Figura 10D), e a quantificação das bactérias resultou em presença de $1,3 \times 10^7$ UFC/mL.

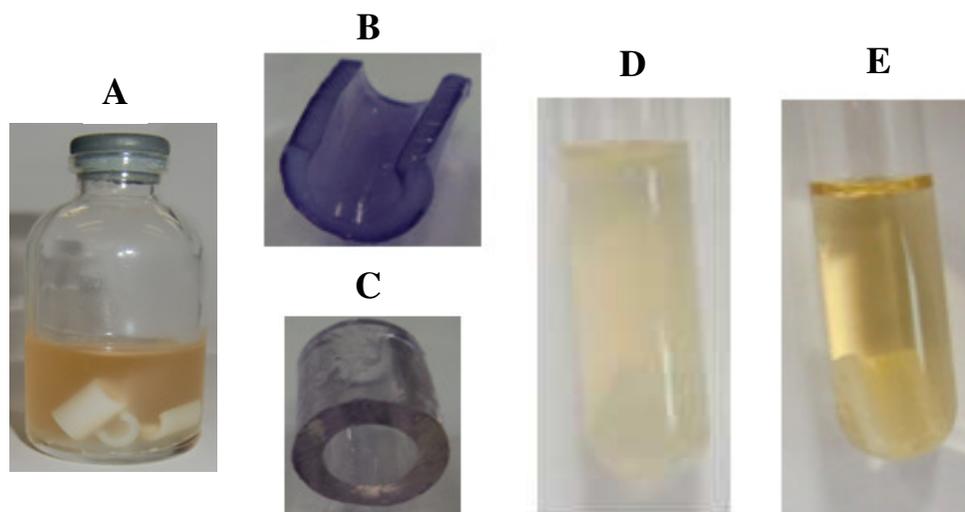


Figura 10- Efeito de APH a 60 °C em fragmento de tubo PVC contaminado por *M. abscessus*. (A) Fragmentos de PVC imersos em caldo Müller Hinton contaminado com a bactéria, incubado por 5 dias a 37 °C; Teste com violeta genciana: (B) controle positivo, com presença de bactérias, e (C) controle negativo, ausência de bactérias; (D) PVC tratado a 60 °C, por 45 min. a 1 atm, após 5 dias. (E) PVC tratado a 60 °C, por 45 min a 250 MPa, após 5 dias.

5. DISCUSSÃO

Bactérias resistentes a ampla gama de antibióticos, agentes físicos e químicos de ação desinfetante e esterilizante, são cada vez mais uma ameaça para a saúde pública. *M. abscessus* é uma bactéria de relevância clínica, que causa surtos de infecção hospitalar e pode ser incluída no grupo das mais resistentes a antimicobacterianos, sendo de difícil tratamento (Petrini, 2006). Assim, a busca por métodos alternativos de inativação de bactérias, como a estudada no presente trabalho, é de grande interesse.

Procedimentos cirúrgicos tais como lipoaspiração, implantes de silicone, cirurgias oculares, e mesmo outros procedimentos invasivos mais simples, como implante de contraceptivo, aplicação de injetáveis e acupuntura, são fontes de infecção por *M. abscessus* (Petrini, 2006; Medjahed *et al.*, 2010). Assim, é imprescindível para o controle dessa bactéria garantir a segurança com a desinfecção e esterilização dos materiais médico-cirúrgicos e biofarmacêuticos. A APH é um método de esterilização que pode ser adequado em situações onde não é viável a utilização de autoclavagem, pasteurização, agentes químicos (óxido de etileno, glutaraldeído).

Sale *et al.*(1970) observaram que várias bactérias na forma esporulada são resistentes a APH, em torno de 800 MPa, e em temperaturas altas (cerca de 70 °C) a inativação foi mais eficiente. No entanto entre pHs 3 e 12, a 100 MPa, a sobrevivência foi menor em pH 8. Os primeiros experimentos utilizando APH tendo como objetivo a inativação de bactérias foram feitos por Hite em 1899, demonstrando que a pressão pode ser utilizada para reduzir carga bacteriana (Smelt, 1998; Campo *et al.*, 2003) .

Na literatura, de acordo com nosso conhecimento, não têm estudos sobre efeito da APH em *M. abscessus*. Para conhecer melhor as condições de viabilidade de *M. abscessus*, estudou-se a inativação dessa micobactéria combinando APH com parâmetros físicos e

químicos, como diferentes temperaturas e condições de pH, em diferentes tempos de exposição. Essas condições são possíveis de se utilizar, por exemplo, em materiais médico-cirúrgicos não autoclaváveis.

Os dados obtidos mostraram que a APH não é suficiente para inativar significativamente *M. abscessus* em temperatura ambiente mesmo após longa exposição (Figura 4), em contraste com estudos envolvendo outros microrganismos, que mostraram significativa inativação (de 6 a 7 ordens de magnitude) tempo-dependente por pressão (Moerman, 2005). Nos vários tempos de exposição estudados, até 90 min, foi observada a 20 °C uma inativação em torno de duas ordem de magnitude ($1,8 \times 10^8$ UFC/mL para $3,9 \times 10^6$ UFC/mL), que não se mostrou tempo-dependente. Fonberg-Broszek *et al.*(2005) mostraram importante relação entre intensidade de alta pressão e inativação de bactérias entre 100 e 500 MPa, sendo que a partir de 300 MPa, para *Listeria monocytogenes*, a inativação por pressão foi claramente tempo-dependente no intervalo de tempo estudado, até 15 min.

Por outro lado, a diminuição da temperatura a -15 °C em suspensões com *M. abscessus* em APH induziu importante inativação tempo-dependente, sendo que em 90 min não se detectou bactéria viável. É importante lembrar que a 250 MPa não ocorre congelamento da solução nessa condição de temperatura. A combinação de APH com temperaturas negativas (-20 °C) na inativação de microrganismos comparando-se com APH a 20 °C foi mostrada previamente em *Saccharomyces cerevisiae*, com quatro ordens de magnitude maior na inativação (Takahashi, 1992). Estudos posteriores confirmaram a eficiência de APH a -20 °C nessa levedura (Hashizume *et al.*,1995). Esses autores demonstraram a cinética de inativação a 180 MPa à temperatura -5 °C ou mais baixas, ou a temperaturas moderadamente elevadas como 40 °C. Picart *et al.*(2004) observaram que para

a bactéria *Listeria innocua* em pressão de 207 MPa e de 300 MPa por 23 min, ocorreu uma adicional inativação de 0,4 ordens de magnitude de inativação bacteriana em 207 MPa e 0,9 ordens de magnitude em 300 MPa, a -3 °C quando comparada à inativação a 20 °C, nesses valores de pressão.

Como a temperatura induziu importante inativação da bactéria por pressão, fez-se um estudo mais detalhado desse efeito em um tempo fixo de 45 min, (Figura 5). Podemos observar que temperaturas moderadamente elevadas aumentam muito a eficiência da inativação a 250 MPa em tempos de exposição relativamente baixo como o utilizado, enquanto que em temperaturas de -15 °C a 40 °C, a redução da carga bacteriana foi baixa, entre duas ($9,0 \times 10^7$ UFC/mL para $7,0 \times 10^5$ UFC/mL) e três ($2,3 \times 10^8$ UFC/mL para 7×10^5 UFC/mL) ordens de magnitude de inativação bacteriana (Figura 5). Moussa *et al.* (2006) encontraram resultados semelhantes utilizando *E. coli*, correspondendo à inativação de cerca de 5 ordens de magnitude maior a -20 °C que a inativação a 25 °C. Os resultados do presente estudo mostram que pode ser obtida uma inativação total da micobactéria em materiais sensíveis à temperatura acima de 40 °C utilizando-se temperaturas subzero (da ordem de -15 °C), porém com maior tempo de tratamento em APH (Figuras 4 e 5).

Ponce *et al.* (1998), mostraram que APH (350 MPa ou mais) inativa mais eficientemente *Escherichia coli* e *Listeria innocua* utilizando-se ciclos de alta pressão do que exposição contínua, sendo que tratamentos em diferentes meios de cultura não alteraram o perfil de inativação. Mostraram também que a 50 °C a inativação nessas condições foram mais efetivas.

Em geral, lipídeos constituintes de membrana e parede de bactérias são mais sensíveis a APH se comparados com proteínas (Winter, Dzwolak, 2005; Fernandes, 2005).

A Figura 11 mostra um esquema dos componentes estruturais da parede celular de micobactéria.

A parede é espessa e rica em ácido micólico, lipoarabinomanose (LAM), manosídeos de fosfatidilinositol (PIMs), com um complexo hidrofóbico muito eficiente como barreira contra moléculas hidrofílicas (Gokhale *et al.*, 2007). Essa composição explica em parte a resistência a vários antibióticos que apresentam caráter hidrofílico, observada neste grupo de bactérias, assim como resistência bacteriana a condições de temperaturas baixas ou próximas de 100 °C (Medjahed *et al.*, 2010). Nossos dados mostram que essa resistência também está presente em condições de temperatura subzero, até – 15 °C, assim como em alta pressão hidrostática de 250 MPa, (Figura 4 e 5). O perfil da cinética de inativação demonstra importante resistência à APH em temperatura ambiente, o que não é diferente de outras espécies de bactérias.

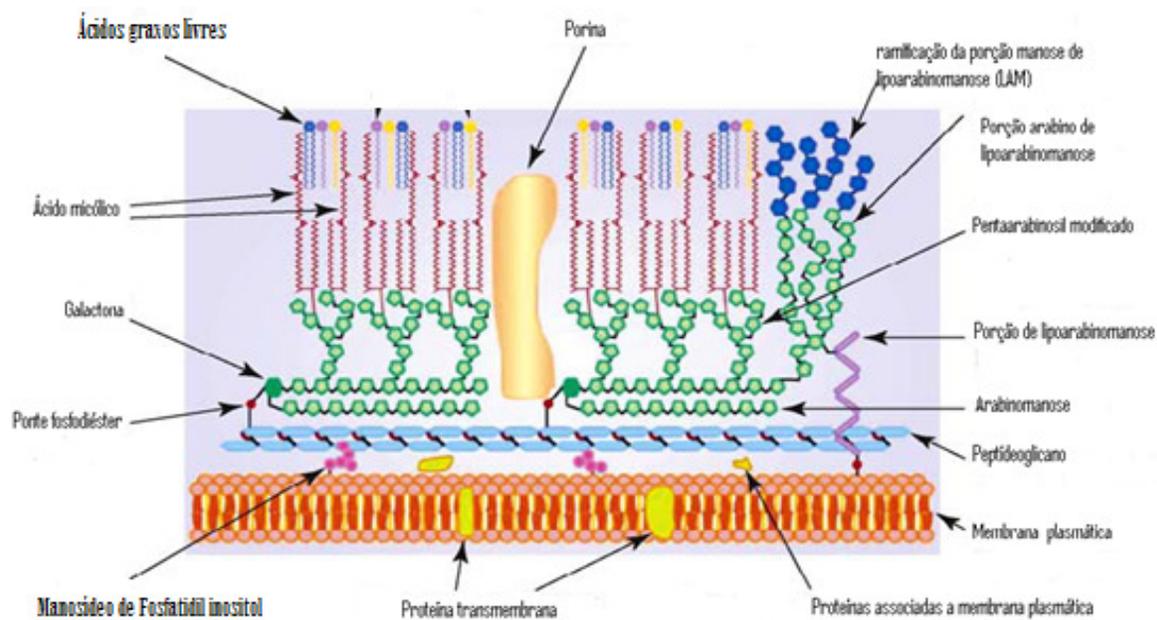


Figura 11- Representação esquemática da parede celular de Mycobacterium. Esquema adaptado de Gokhale *et al.*(2007) .

Uma informação importante é que, além da temperatura e do tempo de tratamento, a inativação por APH depende da fase de crescimento do microrganismo estudado (Rosenthal, Silva, 1997). Portanto, pelo menos os dois primeiros fatores precisam ser bem controlados para que sejam obtidos resultados repetitivos e, portanto, confiáveis, para eficácia e segurança na utilização dessa técnica de esterilização. Conforme Sangronis *et al.*(1997), APH em microrganismos como bactérias pode causar alterações morfológicas, bioquímicas e genéticas que afetam principalmente a membrana e a parede celular. Tais alterações podem aumentar a permeabilidade da célula, desnaturar enzimas importantes no crescimento e reprodução da bactéria. No presente trabalho fez-se cultivo da bactéria em condições controladas, de acordo com o procedimento utilizado para micobactérias de crescimento rápido (Falkinham, 2002), visando reprodutibilidade.

Investigou-se o efeito do pH, buscando outras condições de inativação eficiente da micobactéria por APH. A cinética de inativação em diferentes pHs, (Figura 6), mostrou inativação em pH mais baixo e mais alto. Em pH 4 observou-se uma redução total de carga bacteriana a partir de 15 min em APH, enquanto em pH 9 essa redução foi atingida a partir de 45 min. A inativação por APH só é evidenciada como tempo-dependente em pH 8 e 9 nos intervalos estudados. À pressão atmosférica não foi possível detectar inativação tempo-dependente, embora em pH 3 a inativação foi total a partir de 15 min.

Assim, nos pHs mais altos e mais baixos ocorreu grande sensibilização da bactéria à inativação por APH. Esse comportamento foi observado em *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus plantarum*, que em meio ácido foram mais sensíveis à inativação por pressão quando comparado a pH perto de 7. Também *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Staphilococcus faecalis* apresentaram maior inativação por APH em pH 4 (Molina-Gutierrez *et al.*, 2002). Alpas *et al.*, (2000) observaram que a pressurização a

345 MPa, entre pH 4 e 5, induziu a perda da viabilidade de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* entérica *Enteritidis* de cerca de 1 para 4 ordens de magnitude, quando comparado o tratado com a mesma pressão em pH 6,5.

Sabe-se que valores de pH entre 5,0 e 6,5 são ótimos para desenvolvimento das micobactérias de crescimento rápido, como *M. abscessus* (Portaels, Pattyn, 1982), o que pode estar relacionado à maior resistência contra a inativação por APH, com maior sensibilidade em condições mais alcalinas e mais ácidas, tanto à pressão atmosférica quanto em APH, (Figuras 6 e 7). A maior sensibilidade a pH alcalino pode estar relacionada ao pH ótimo mencionado, de 5,0 a 6,5.

Smelt (1998) e Molina-Gutierrez *et al.*(2002) relataram que a APH conjuntamente com condições ácidas pode afetar o pH intracelular dos microrganismos, podendo ocorrer aumento da permeabilidade citoplasmática e favorecimento da inativação de enzimas que dependem do equilíbrio entre pH intra e extra-celular. Outros estudos demonstraram que a redução no pH do meio de tratamento causa um aumento progressivo na sensibilidade da bactéria à pressão (Stewart *et al.*, (1997).

Sabe-se que o pH interno é crítico para o controle de vários processos celulares, tais como a síntese de ATP, de RNA e proteínas, replicação de DNA e crescimento celular (Molina-Gutierrez *et al.*, 2002). É possível que alguns desses eventos tenham sido alterados, explicando a subletalidade ou letalidade do tratamento com APH em determinados pHs no *M. abscessus*.

De acordo com Rottman *et al.*(2007), *M. abscessus* é um parasita intracelular capaz de crescer em macrófagos e amebas de vida livre. Trata-se de uma bactéria bem adaptável às condições do ambiente e que dispõe de mecanismos que facilitam a invasão celular.

Considerando estes aspectos foram realizados no presente trabalho ensaios de

adesão com *M. abscessus* em células HEp-2 (células de câncer de laringe humano). Podemos observar na Figura 8A, controle negativo, que há preservação das características das células HEp-2. Portanto, não mostra alteração ou qualquer desordem estrutural das células infectadas com *M. abscessus*, assim como na Figura 8B, na qual as bactérias foram tratadas a 250 MPa (20 °C, por 45 min). Esse comportamento está de acordo com resultados descritos na literatura para essa bactéria (Pan *et al.*, 2009). O tratamento da bactéria com pressão, que levou à inativação de uma ordem de magnitude (Figuras 4 e 5), aparentemente não inviabilizou a capacidade de adesão do *M. abscessus*. Este ensaio não objetivou detalhar efeitos da bactéria nas células HEp-2, mas avaliar se APH em condição subletal seria capaz de interferir na adesão bacteriana das células infectadas. Isso sugere que somente o efeito da APH a 250 MPa não é capaz de causar danos nos mecanismos de adesão, e conseqüentemente impedir a capacidade de infectividade de *M. abscessus*.

É interessante notar que imagens de microscopia eletrônica de varredura, comparadas ao controle sem pressão, mostraram alterações morfológicas de *M. abscessus* em pressão de 250 MPa a 50 °C e 60 °C (45 min), condições de tratamento que inativam, significativamente (50 °C) ou totalmente (60 °C) a bactéria, (Figura 5).

Alterações estruturais observadas por microscopia eletrônica de varredura na célula bacteriana provocadas pelo efeito da APH (400 MPa a 20 °C por 10 min) são mostradas em *Salmonella* entérica *Typhimurium* como invaginações na parede, e lesões bastante distintas em *Listeria monocytogenes*, como pequenas protuberâncias na parede da bactéria, descritas como cicatrizes de gema (Tholozan *et al.*, 2000). Em posterior trabalho também com *L. monocytogenes* após tratamento em APH, Ritz *et al.*(2002) encontraram imagens muito semelhantes de microscopia eletrônica de varredura da bactéria, mostrando que essas alterações morfológicas foram bem características da espécie estudada.

Microscopia eletrônica de transmissão de *Salmonella* entérica *Thompson* e *Listeria monocytogenes* após pressurização mostraram claras alterações morfológicas, interpretadas como diferentes graus de vacuolização e outras mudanças no conteúdo interno (Mackey *et al.*, 1994).

No referido estudo foi realizado um teste de esterilidade em fragmento de tubo PVC, mostrado nas respectivas Figuras 10A e 10B. A incubação do material obedeceu ao tempo de crescimento de *M. abscessus* que é de 3 a 5 dias, com carga bacteriana 1×10^8 UFC/mL. O tratamento a 250 MPa, por 45 min e temperatura de 60 °C foi o suficiente para não se observar crescimento no caldo Müller Hinton (Figura 10B). Isto sugere que não teve bactérias viáveis após o tratamento do material contaminado nas condições citadas anteriormente.

O uso da APH no tratamento de materiais médico-cirúrgico e produtos biológicos pode ser uma alternativa às outras técnicas de uso convencional, pois dispõe de algumas possibilidades, tais como utilização em temperaturas baixas, ausência de resíduos tóxicos, baixo custo energético, ao contrário de autoclavagem por vapor seco ou úmido, tratamento com agentes químicos (óxido de etileno, glutaraldeído 2%), e radiação gama, dentre outras.

Portanto, é imprescindível determinar parâmetros na aplicação da APH no que se refere à inativação microbiana. A eficiência da aplicação depende diretamente das condições estabelecidas para o tratamento, que pode ter o propósito de reduzir carga microbiana, ou de esterilização.

Em síntese, a cinética de inativação de microrganismos pelo calor tem sido extensivamente pesquisada. No entanto, são limitados os estudos relacionados à cinética de inativação por APH, especialmente em condições de aplicação simultânea de alta pressão e outras técnicas de processamento (Buzrul, Alpas, 2004). No presente estudo utilizando *M.*

abscessus, a combinação de APH com agentes físicos e químicos mostrou ser capaz de induzir completa inativação dessa micobactéria de grande relevância clínica. A confirmação desse efeito diretamente em um material comum em hospitais, como o utilizado, podendo eliminar a bactéria mesmo em sua presença maciça, é de grande relevância no sentido de se utilizar uma metodologia dessa natureza. A inativação de outros patógenos de importância hospitalar utilizando essa metodologia é de grande interesse e aplicabilidade, abrindo uma nova abordagem em esterilização.

6. CONCLUSÕES

- Os tratamentos com APH foram efetivos na inativação completa da cepa ATCC 2544 de *M. abscessus* em extremos de temperatura (-15 °C e 60 °C) e de pH (pH 4.0 e 9.0);
- O teste de esterilidade feito com fragmento de tubo PVC confirma a eficácia da inativação por APH a 60 °C em material carreador, sugerindo aplicabilidade em materiais médicos-cirúrgicos;
- Os ensaios com células HEp-2 não mostraram alterações das mesmas quando tratadas com bactérias submetidas previamente à APH em condições subletais, indicando que APH nessas condições não é capaz de inibir os mecanismos de adesão de *M. abscessus*;
- A microscopia de varredura sugere alterações na estrutura das bactérias submetidas à APH.

7. REFERÊNCIAS

- ABE, F., KATO, C., HORIKOSHI, K. (1999). Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends in Microbiology* **7**, 447-453.
- ACHARYA, N., VARSHNEY, U. (2002). Biochemical properties of single-stranded DNA-binding protein from *Mycobacterium smegmatis*, a fast-growing mycobacterium and its physical and functional interaction with uracil DNA glycosylases. *Journal of Molecular Biology* **318**, 1251-1264.
- ALPAS, H., KALCHAYANAND, N., BOZOGLU, F., RAY, B. (2000). Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *International Journal Food Microbiol* **60**, 33-42.
- ANANTA, E., HEINZ, V., KNORR, D. (2004). Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology* **21**, 567-577.
- BATTISTELLI, M., BORZI R.M., OLIVOTTO, E., VITELLOZZI, R., BURATTINI, S., FACCHINI, A. (2005) Cell and matrix morpho-functional analysis in chondrocyte micromasses. *Microscopy Research and Technique* **67**, 286-295.
- BELLO, T., RIVERA-OLIVERO, I.A., WAARD, J.H. (2006). Inactivation of mycobacteria by disinfectants with a tuberculocidal label. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **24**, 319-21.
- BIGATA, X., RIBERA, M., BIELSA, I., FERRANDIZ, C.(2001). Adverse granulomatous reaction after cosmetic dermal silicone injection. *Dermatologic Surgery* **27**, 198-200.
- BROWN-ELLIOTT, BA., WALLACE, R.J. (2002). Clinical and taxonomic status of

- pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 716-746.
- BUZRUL, S., ALPAS, H. (2004). Modeling the synergistic effect of high pressure and heat on inactivation kinetics of *Listeria innocua*: a preliminary study. *FEMS microbiology letters* **238**, 29-36.
- CAMPOS, F.P., DOSUALDO, G.L., CRISTIANINI, M. (2003). Utilização da Tecnologia de Alta Pressão no Processamento de Alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*. **6**, 351-357.
- CARTER, G., WU, EA., DRUMMOND, D.C., BERMUDEZ, L.E. (2003) Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium*. *Journal of Medical Microbiology* **52**, 747-52.
- CLERY-BARRAUD, C., GAUBERT, A., MASSON, P., VIDAL, D. (2004) Combined effects of high hydrostatic pressure and temperature for inactivation of *Bacillus anthracis* spores. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 635-637.
- Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. (1997). This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **156**, 1-25.
- DIEHL, P., SCHMITT, M., SCHAUWECKER, J., EICHELBERG, K., GOLLWITZER H., GRADINGER, R. (2005). Effect of high hydrostatic pressure on biological properties of extracellular bone matrix proteins. *International Journal of Molecular Medicine* **16**, 285-289.
- ESTEBAN, J., GADEA, I., ZAMORA, N., ORTIZ, A., FERNANDEZ-ROBLAS, R. [Assessment of the invasiveness of rapidly-growing nonpigmented mycobacteria with

- the fibroblast microcolony assay]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. (2006) **24**, 551-555. Evaluación de la capacidad invasiva de las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido mediante el estudio de la morfología de las microcolonias en fibroblastos.
- FALKINHAM, J.O, 3rd. (2002). Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clinics in Chest Medicine* **23**, 529-551.
- FERNANDES, P.M.B. (2005). How does yeast respond to pressure? *Brazilian Journal Medical and Biological Research* **38**, 1239-1245.
- FONBERG-BROCZEK, M., WINDYGA, B., SZCZAWINSKI, J., SZCZAWINSKA, M., PIETRZAK, D., PRESTAMO, G. (2005). High pressure processing for food safety. *Acta Biochimica Polonica* **52**, 721-724.
- FOX, L.P., GEYER, A.S., HUSAIN, S., DELLA-LATTA, P., GROSSMAN, M.E. (2004) *Mycobacterium abscessus* cellulitis and multifocal abscesses of the breasts in a transsexual from illicit intramammary injections of silicone. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **50**, 450-454.
- GOKHALE, R.S., SAXENA, P., CHOPRA, T., MOHANTY, D. (2007). Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids. *Natural Product Reports* **24**, 267-277.
- GOLLWITZER, H., MITTELMEIER, W., BRENDLE, M., WEBER, P., MIETHKE, T., HOFMANN, G.O. (2009). High hydrostatic pressure for disinfection of bone grafts and biomaterials: an experimental study. *The Open Orthopaedics Journal* **3**, 1-7.
- GRIFFITH, D.E. (2003). Emergence of nontuberculous mycobacteria as pathogens in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **167**, 810-812.

- HASHIZUME, C., KIMURA, K., HAYASHI, R. (1995). Kinetic-Analysis of Yeast Inactivation by High-Pressure Treatment at Low-Temperatures. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **59**, 1455-1458.
- HINRICHSEN, S.L. (2007). Micobactéria de Crescimento Rápido - MCR. *Pratica Hospitalar* **9**,1-6.
- HOWARD, S.T., RHOADES, E., RECHT, J., PANG, X., ALSUP, A., KOLTER, R. (2006). Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**, 1581-1590.
- HUANG, Y.C., LIU, M.F., SHEN, G.H., LIN, C.F., KAO, C.C., LIU, P.Y. (2010). Clinical outcome of *Mycobacterium abscessus* infection and antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* **43**, 401-406.
- HUGAS, M., GARRIGA, M., MONFORT, J.M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* **62**, 359-371.
- JULIAN, E., ROLDAN, M., SANCHEZ-CHARDI, A., ASTOLA, O., AGUSTI, G., LUQUIN, M. (2010). Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *Journal of Bacteriology* **192**, 1751-1760.
- KATOCH, V.M. (2004). Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *The Indian Journal of Medical Research* **120**, 290-304.
- KESSLER, A., KOURTIS, A. (2004). *Mycobacterium abscessus* as a cause of pacemaker infection. *Medical Science Monitor* **10**, 60-62.
- LAVINAS, F.C., LOPES, M.L.M., MESQUITA, V.L.V. (2007). Efeito da Alta Pressão Hidrostática sobre a inativação de microrganismos. *Boletim do Centro de Pesquisa de*

Processamento de Alimentos 25, 1-12.

- LE DANTEC, C., DUGUET, J.P., MONTIEL, A., DUMOUTIER, N., DUBROU, S., VINCENT, V. (2002). Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5318-5325.
- LEVY-FREBAULT, V., DAFTE, M., GOH, K.S, LANEELLE, M.A., ASSELINEAU, C., DAVID, H.L. (1983). Identification of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. *Journal of Clinical Microbiology* **17**, 744-752.
- LIEBESKIND, D.S.O, N., WASTERLAIN, C.G., BUTTNER, E.A. (2001). Neurologic manifestations of is seminated infection with *Mycobacterium abscessus*. *Neurology* **56**, 1-4.
- MACKEY, B.M., FORESTIERE, K., ISAACS, N.S., STENNING, R., BROOKER, B. (1994). The Effect of high hydrostatic-pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letters Applied Microbiology* **19**, 429-432.
- MASSON, P., TONELLO, C., BALNY C. (2001). High pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *Journal of biomedicine & biotechnology*. **1**, 85-88.
- MCFARLAND, J. (1907). The nephelometer - An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *The Journal of the American Medical Association*. **14**, 1176-1178.
- MCGAW, L.J, LALL, N., HLOKWE, T.M., MICHEL, A.L., MEYER, J.J., ELOFF, J.N.(2008). Purified compounds and extracts from *Euclea* species with antimycobacterial activity against *Mycobacterium bovis* and fast-growing mycobacteria. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **31**, 1429-1433.

- MEDJAHED, H., GAILLARD, J.L., REYRAT J.M. (2010). *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends in microbiology* **18**, 117-123.
- 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.
- MOLINA-GUTIERREZ, A., STIPPL, V., DELGADO, A., GANZLE, M.G., VOGEL, R.F. (2002). In situ determination of the intracellular pH of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* during pressure treatment. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4399-4406.
- MOUSSA, M., PERRIER-CORNET, J.M., GERVAIS, P. (2006). Synergistic and antagonistic effects of combined subzero temperature and high pressure on inactivation of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **72**, 150-156.
- MURILLO, J., TORRES, M., BOFILL, L., RIOS-FABRA, A., IRAUSQUIN, E., ISTURIZ, R. (2000). Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria - An unexpected complication of liposuction and liposculpture. *Archives Dermatology* **136**, 1347-1352.
- NAAL, F.D., SCHAUWECKER, J., STEINHAUSER, E., MILZ, S., VON KNOCH, F., MITTELMEIER, W. (2008). Biomechanical and immunohistochemical properties of meniscal cartilage after high hydrostatic pressure treatment. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied Biomaterials* **87**, 19-25.
- NEUMAN R.C., KAUZMANN W., ZIPP A. (1973). Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *The Journal Physical Chemistry* **77**, 1-5.
- NEWMAN, M.I., CAMBEROS, A.E., ASCHERMAN, J. (2005). *Mycobacteria abscessus*

- outbreak in US patients linked to offshore surgicenter. *Annals of Plastical Surgery*. 55, 107-110.
- PALADINI, A. A., WEBER, G. (1981). Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry* **20**, 1-7.
- PAN, Y.P., TENG, D., BURKE, A.C., HAASE, E.M., SCANNAPIECO, F.A. (2009). Oral bacteria modulate invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Pathogenesis* **46**, 73-79.
- PETRINI, B. (2006). *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. **114**, 319-328.
- PICART, L., DUMAY., E., GUIRAUD, J.P., CHEFTEL, J.C. (2004). Microbial inactivation by pressure-shift freezing: effects on smoked salmon mince inoculated with *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* and *Listeria innocua*. *Lebens - Wiss Technology* **37**, 1-12.
- PONCE, E., PLA, E., SENDRA, E., GUAMIS, B., MOR-MUR, M. (1998) Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology* **43**,15–19.
- PORTAELS, F., PATTYN, S.R. (1982). Growth of mycobacteria in relation to the Ph of the medium. *Microbiology* **133**, 213-221.
- RIPOLL, F., PASEK, S., SCHENOWITZ, C., DOSSAT, C., BARBE, V., ROTTMAN, M. (2009). Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *Plos One* **4**, 1-10.
- 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.
- RIVALAIN, N., ROQUAIN, J., DEMAZEAU, G. (2010). Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnology Advances* **28**, 659-672.
- ROSENTHAL, A., SILVA, J.L. (1997). Alimentos sobre pressão. *Engenharia de Alimentos* **14**,1-3.
- ROTTMAN M., CATHERINOT E., HOCHEDÉZ P., EMILE J.F., CASANOVA J.L., GAILLARD, J.L. (2007). Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice. *Infection and immunity* **75**, 5898-5907.
- RUTALA, W.A., GERGEN, M.F., WEBER, D.J. (1998). Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: ethylene oxide, 2 plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid. *American Journal of Infection Control* **26**, 393-398.
- SAEED, M.U., JAFREE, A.J., DECOCK, R., NASH, J. (2004). An unusual pathogen causing microbial keratitis. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* **82**, 606-608.
- SALE, A.J.H., GOULD, G.W., HAMILTON, W.A. (1970). Inactivation of bacterial Spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology* **60**, 323-334.
- SANGRONIS, E., POTHAKAMURY, U., RAMOS, A.M., IBARZ, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. (1997). La alta presión hidrostática: Una alternativa en el procesamiento notérmico de alimentos. *Revista Alimentária* **28**,33-43.
- SCALETISKY, I.C, SILVA, M.L, TRABULSI, L.R. (1984) Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and*

- immunity. **45**, 534-536.
- SMELT, J.P.P.M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Science Technology* **9**, 152-158.
- SPIILIMBERGO, S., ELVASSORE, N., BERTUCCO, A. (2002). Microbial inactivation by high-pressure. *Journal Supercritical Fluid* **22**, 55-63.
- STEWART, C.M., JEWETT, F.F., DUNNE, C.P, HOOVER, D.G. (1997). Effect of concurrent high hydrostatic pressure, acidity and heat on the injury and destruction of *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Safety* **17**, 23-36.
- SUGIMOTO, H., ITO, M., HATANO, M., NAKANISHI, Y., MARUYAMA, Y., YOSHIZAKI, T. (2010). A case of chronic otitis media caused by *Mycobacterium abscessus*. *Auris, Nasus, Larynx* **37**, 636-639.
- TAKAHASHI, K. (1992). Sterilization of microorganisms by hydrostatic pressure at low temperature. *Colloque Inserm* **224**, 303-307.
- THOLOZAN, J.L., RITZ, M., JUGIAU, F., FEDERIGHI, M., TISSIER, J.P. (2000). Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 202-212.
- TORREZAN, R. (2003). Uso da tecnologia de alta pressão para a inativação de microrganismos em produtos cárneos. *Boletim do Centro de Processamento de Alimentos* **21**,1-18.
- UEKI, S.Y.M., MARTINS, M.C.,TELLES, M.A.S.,VIRGILIO, M.C., GIAMPAGLIA, C.M.S., CHIMARA, E., FERRAZOLI, L. (2005). Micobactérias não Tuberculosas: Diversidade das Espécies no Estado de São Paulo. *Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial* **41**, 1-8.

WINTER, R., DZWOLAK, W. (2005). Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **363**, 537-562.

WUYTACK, E.Y., DIELS, A.M., MICHIELS, C.W. (2002). Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 205-212.

APÊNDICE

Tabelas com os valores de UFC/mL obtidos dos experimentos mostrados nas figuras 4 a 6.

Tabela 1. Valores de UFC/mL obtidos dos experimentos mostrados na Figura 4

T (°C) (250 MPa)	Tempo (min)	UFC/mL	Log (UFC/mL)
-15	0*	$1,0 \times 10^8$	8,00
	10	$1,0 \times 10^8$	8,00
	30	$9,5 \times 10^5$	5,97
	45	$7,0 \times 10^5$	5,84
	90	0	0
20	0	$1,8 \times 10^8$	8,25
	10	$5,0 \times 10^6$	5,69
	30	$1,1 \times 10^7$	7,04
	45	$6,0 \times 10^6$	6,78
	90	$3,9 \times 10^6$	6,59

*Pressão 0,1 MPa

Tabela 2. Valores de UFC/mL obtidos dos experimentos mostrados na Figura 5

Tempo (min)	T (°C)	UFC/mL (0,1 MPa)	Log (UFC/mL)	UFC/mL (250 MPa)	Log (UFC/mL)
45	-15	$9,0 \times 10^7$	7,95	$7,0 \times 10^5$	5,84
	-10	$1,6 \times 10^8$	8,02	$1,6 \times 10^6$	6,20
	-5	$1,2 \times 10^8$	8,07	$8,2 \times 10^5$	5,91
	0	$1,5 \times 10^8$	8,17	$2,0 \times 10^6$	6,30
	10	$1,3 \times 10^8$	8,11	$8,0 \times 10^4$	4,90
	20	$1,0 \times 10^8$	8,00	$6,0 \times 10^6$	6,77
	40	$2,3 \times 10^8$	8,36	$7,0 \times 10^5$	5,84
	45	$1,0 \times 10^8$	8,00	$8,0 \times 10^4$	4,90
	50	$3,8 \times 10^8$	8,57	$1,8 \times 10^3$	3,25
	55	$1,0 \times 10^8$	8,00	$8,0 \times 10^2$	2,90
	60	$1,1 \times 10^8$	8,04	0	0
	70	$2,0 \times 10^8$	8,30	0	0

Tabela 3. Valores de UFC/mL obtidos dos experimentos mostrados na Figura 6

Tempo (min)	pH	UFC/mL (0,1 MPa)	Log (UFC/mL)	UFC/mL (250 MPa)	Log (UFC/mL)	
15	3	0	0	0	0	
	4	$3,0 \times 10^4$	4,47	0	0	
	5	$9,5 \times 10^7$	7,97	$1,3 \times 10^6$	6,11	
	6	$7,0 \times 10^7$	7,84	$2,2 \times 10^6$	6,34	
	7	$6,0 \times 10^7$	7,77	$1,7 \times 10^6$	6,23	
	8	$9,5 \times 10^6$	6,97	$1,3 \times 10^3$	3,11	
	9	$2,0 \times 10^4$	4,30	$3,9 \times 10^3$	3,59	
	30	3	0	0	0	0
		4	$3,0 \times 10^4$	4,47	0	0
5		$7,0 \times 10^7$	7,84	$1,3 \times 10^6$	6,11	
6		$6,0 \times 10^7$	7,77	$2,0 \times 10^6$	6,30	
7		$8,0 \times 10^7$	7,90	$5,5 \times 10^6$	6,74	
8		$8,0 \times 10^6$	6,90	$1,0 \times 10^1$	1,00	
9		$5,5 \times 10^5$	5,74	$1,2 \times 10^2$	2,07	
45		3	0	0	0	0
		4	$5,0 \times 10^3$	3,69	0	0
	5	$5,5 \times 10^7$	7,74	$1,3 \times 10^6$	6,11	
	6	$1,4 \times 10^7$	7,14	$8,5 \times 10^4$	4,92	
	7	$8,5 \times 10^7$	7,92	$1,8 \times 10^6$	6,25	
	8	$4,0 \times 10^6$	6,60	$1,0 \times 10^1$	1,00	
	9	$5,0 \times 10^4$	4,69	0	0	