

Carolina Dell'Santo Vieira Schwartz¹
Filippe Gadiolli Pimentel²
Helber Barcellos da Costa¹
Renan Vasconcelos Santos³
Antonio Alberto Ribeiro Fernandes⁴
Patricia Machado Bueno Fernandes⁵

**High hydrostatic pressure
applications in health sciences**

| Aplicações da alta pressão hidrostática nas Ciências da Saúde

ABSTRACT | *Introduction: The effect of pressure on biological systems has aroused interest in several studies, mainly because the application of high values of hydrostatic pressure induces changes in the structures of macromolecules, as well as on physiological and biochemical processes in the cells. High hydrostatic pressure treatment produces unique effects on biological systems and may even form products with new functional properties. Objective: The main focus of this review is on the recent studies on high hydrostatic pressure applications as a biotechnological tool in health sciences with emphasis on its action in proteins and enzymes structures, in food decontamination, in amyloidogenic diseases and cancer, and in the production of antiviral vaccines. Methodology: Bibliographic revision.*

Result and conclusion: The present report attempts to identify the great potential of this technique in health research.

Keywords | *High hydrostatic pressure; Health sciences; Biotechnology; Proteins; Food decontamination; Amyloidogenic diseases; Cancer; Antiviral vaccines.*

RESUMO | *Introdução: O efeito da pressão em sistemas biológicos tem despertado o interesse em diversos estudos, principalmente, porque a aplicação de altos valores de pressão hidrostática induz mudanças nas estruturas de macromoléculas e, também, nos processos fisiológicos e bioquímicos celulares. O tratamento com pressão hidrostática produz efeitos únicos nos sistemas biológicos, podendo, inclusive, formar produtos com novas propriedades funcionais. Objetivo: O enfoque desta revisão está nos recentes estudos sobre as aplicações da alta pressão hidrostática como ferramenta biotecnológica nas ciências da saúde com ênfase em sua ação nas estruturas das proteínas e enzimas, na descontaminação de alimentos, nas doenças amiloidogênicas e câncer e na produção de vacinas antivirais. Metodologia: Revisão bibliográfica. Resultado e conclusão: O presente artigo apresenta a grande potencialidade da técnica da alta pressão hidrostática nas pesquisas em saúde.*

Palavras-chave | *Alta pressão hidrostática; Ciências da saúde; Biotecnologia; Proteínas; Descontaminação de alimentos; Doenças amiloidogênicas; Câncer; Vacinas antivirais.*

¹Mestre em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo.

²Mestre em Biologia Molecular, Universidade Federal de Ouro Preto.

³Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo.

⁴Doutor em Ciências dos Materiais pelo Instituto Militar de Engenharia (IME), Rio de Janeiro; professor associado; diretor do Núcleo de Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Espírito Santo; representante da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) no Estado do Espírito Santo.

⁵Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; professor associado; coordenador da Pós-Graduação em Biotecnologia; e presidente da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Universidade Federal do Espírito Santo; membro titular da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTN-Bio) do Ministério da Ciência e Tecnologia.

INTRODUÇÃO |

Aproximadamente 70% da biosfera é coberta por água, e todos os organismos que vivem em ambientes aquáticos estão, em diferentes graus, submetidos à pressão hidrostática. Mais ainda, considerando que a água é um componente essencial à vida, a grande maioria das células estão, de alguma forma, submetidas à pressão. A pressão hidrostática, parâmetro físico capaz de induzir uma variedade de adaptações morfológicas e fisiológicas^{24,41,84} nos organismos, medida em Pascal (1 atm equivale a aproximadamente 0,1 MPa), é definida fisicamente como a pressão exercida pelo peso de uma coluna fluida (líquida ou gasosa) em equilíbrio, dependente da densidade do fluido, profundidade e da gravidade local⁷³.

A expressão “alta pressão hidrostática” (HHP, do inglês *High Hydrostatic Pressure*) é usada sempre que comparamos as pressões sentidas pelos seres vivos na natureza, tanto em sua superfície quanto nas profundezas dos oceanos. Por exemplo, a pressão exercida pelo sangue circulante nas paredes dos vasos sanguíneos, um dos principais sinais vitais, assim como pelo conteúdo da célula contra a parede celular de vegetais e de micro-organismos é determinada pelo teor de água e, portanto, resultante da pressão hidrostática. Nas Fossas Marianas, a pressão chega a 1.100 vezes a pressão atmosférica; isto é, aproximadamente 110 MPa. Nas aplicações biotecnológicas da pressão, normalmente são utilizadas pressões entre os 100 e 1000 MPa.

O princípio de *Le Chatelier*, segundo o qual qualquer reação, alteração conformacional ou de transição de fase, que seja acompanhada de uma redução de volume, será sempre favorecida pela pressão, é o princípio físico que serve de base para o estudo do efeito da alta pressão hidrostática nos organismos vivos².

Assim, pode-se dizer que, quando um processo ocorre com um aumento no volume do sistema, a pressão age inibindo o processo. Por outro lado, quando o processo é acompanhado por uma diminuição no volume do sistema, a pressão age favorecendo o processo. Portanto, a pressão é capaz de alterar o equilíbrio de reações químicas de maneira a favorecer a conformação de menor volume⁵⁵. De fato, a pressão hidrostática promove uma redução no volume celular, levando a alterações no citoesqueleto, na parede celular e em outros componentes celulares. Afeta severamente a membrana plasmática promovendo uma maior compactação dos lipídeos, podendo interferir nos processos de difusão, comprometer a estrutura e, conseqüentemente, a atividade de proteínas de membrana. Além disso, a pressão interfere em processos, como a

divisão celular e a polimerização de proteínas^{1,25,60}.

Estudos em vários sistemas de pequenas moléculas têm trazido informações sobre os efeitos da pressão em interações intermoleculares não covalentes, importantes para elucidar os efeitos da pressão sobre as demais macromoléculas biológicas. Dessa forma, demonstrou-se que as ligações de hidrogênio são estabilizadas pela alta pressão⁵. Interações hidrofóbicas, que desempenham um papel substancial na estabilização da estrutura terciária de proteínas e em interações proteína-proteína, são desestabilizadas sob alta pressão. Por outro lado, interações de empilhamento entre anéis aromáticos do DNA mostram alterações negativas de volume e são estabilizadas pela pressão^{35,63}.

Assim, para que se estudem os efeitos da alta pressão sobre a mudança da estrutura tridimensional das proteínas, por exemplo, é necessário que se conheça o efeito da pressão sobre as interações químicas que estão envolvidas no enovelamento dessa macromolécula (Quadro 1).

Quadro 1 – Efeito da alta pressão sobre as interações químicas⁶²

Tipo de Interação	Efeito da pressão
Covalente	Estabilização
Iônica	Desestabilização
Hidrogênio	Estabilização ou baixa desestabilização
Hidrofóbica	Desestabilização
Tipo de Interação	Efeito da pressão
Covalente	Estabilização
Iônica	Desestabilização
Hidrogênio	Estabilização ou baixa desestabilização
Hidrofóbica	Desestabilização

O aumento da pesquisa básica, com o intuito de elucidar os mecanismos de ação da aplicação de altas pressões hidrostáticas sobre os sistemas biológicos, tem levado ao desenvolvimento de novas ferramentas nas Ciências da Saúde, utilizando a pressão como agente principal. Pode-se ressaltar, por exemplo, o estudo da desagregação de proteínas, a elaboração de vacinas antivirais, a modulação da qualidade e segurança dos alimentos e novas perspectivas para a indústria farmacêutica.

O desenvolvimento da biologia molecular e de novas tecnologias biofísicas adaptadas à alta pressão tem permitido análises cada vez mais refinadas dos efeitos da pressão sobre as células e macromoléculas biológicas em geral. Como exemplos, desenvolvimentos em

espectroscopia permitem detectar discretas mudanças conformacionais induzidas pela pressão nos arredores dos resíduos aromáticos dos aminoácidos⁵³. Técnicas espectroscópicas de fluorescência indicam alterações localizadas na célula e nas moléculas⁶⁴. A ressonância magnética nuclear, por sua vez, é capaz de fornecer uma quantidade muito grande de detalhes⁴⁷ e técnicas, como a difração de raios X, utilizando uma fonte síncrotron que fornece detalhes importantes sobre a estrutura global das proteínas em função da pressão ou da temperatura⁷⁹.

Na Biologia Molecular, um número cada vez maior de estudos sobre o efeito da pressão hidrostática é realizado envolvendo técnicas de microarranjo, nas quais é possível a avaliação da expressão de muitos genes (ou de todos, se for o caso) ao mesmo tempo, em resposta a uma condição determinada⁴.

Esses novos desenvolvimentos metodológicos tornaram possível a utilização de alta pressão hidrostática em um grande número de aplicações, consolidando-a como uma promissora ferramenta biotecnológica da ciência atual.

PROTEÍNAS E ENZIMAS |

As proteínas e enzimas estão entre as macromoléculas mais estudadas para a elucidação dos mecanismos de ação da aplicação pressão hidrostática²⁸, devido ao fato de que mudanças de volume estão associadas a importantes alterações bioquímicas na dissociação e desnvolvimento de proteínas⁶⁰.

Muitas enzimas podem ter suas atividades moduladas sob alta pressão hidrostática, por exemplo, a especificidade das proteases. Isso é possível porque, em valores de pressão menores que 200 MPa, a estabilidade e a funcionalidade de muitas enzimas não se alteram⁶².

Algumas enzimas, no entanto, perdem suas atividades com o aumento da pressão. Por exemplo, a enzima álcool desidrogenase hepática de cavalo perde sua atividade entre valores de pressão de 100 a 400 MPa⁶².

Inseridos nesse contexto, extensivos trabalhos têm surgido no estudo de modulação da atividade e da cinética de diferentes enzimas de interesse industrial e biotecnológico sob alta pressão hidrostática.

O tratamento com pressões maiores que 500 MPa pode desnaturar proteínas, enquanto tratamentos com valores de pressão moderadas (~ 200 MPa) em geral apenas afetam a estrutura quaternária, levando à dissociação de proteínas oligoméricas. Embora não causem a desnaturação total da proteína, tais tratamentos moderados de pressão podem

gerar importantes modificações conformacionais, com conseqüências nas reações enzimáticas, no funcionamento e nas interações das proteínas⁵⁶.

Os métodos clássicos de estudo de enovelamento, desnaturação e dissociação de proteínas utilizam o calor ou agentes químicos desnaturantes como ferramentas principais⁷⁰. No entanto, do ponto de vista químico, a alta pressão hidrostática pode manter algumas partes da molécula inalterada ou promover desnaturação reversível, dentro de uma faixa-limite, devido ao fato de que apenas interações fracas são afetadas, enquanto a desnaturação causada pela temperatura e/ou agente químico é geralmente irreversível e leva à agregação, provavelmente devido ao aumento nas interações hidrofóbicas. É devido a isso que os mecanismos de desnaturação induzida por pressão são diferentes dos observados utilizando a temperatura ou produtos químicos^{63,70}.

Do ponto de vista bioquímico, a pressão tem um papel importante na estabilização de estrutura terciária de proteínas e em interação proteína-proteína, devido à sensibilidade das interações hidrofóbicas à pressão⁶².

Ainda em um olhar químico, as interações eletrostáticas não são favorecidas pela pressão. Além disso, a entrada de moléculas de água parece desempenhar um importante papel no processo de desnaturação proteica induzida por alta pressão⁶².

A modificação no grau de hidratação da proteína sobre o efeito da pressão pode ser explicada por dois principais fatores: primeiro, a abertura de cavidades permite que o solvente ocupe um volume interno que foi anteriormente excluído a partir de interações com esse solvente. Segundo, a área de superfície de contato do solvente é maior na proteína que se desdobrou pela pressão do que na proteína nativa^{63,78}.

Assim, a estabilidade das proteínas sob alta pressão dependerá, principalmente, da sua estabilidade conformacional, ou seja, o quanto a proteína será capaz de compensar a perda das interações fracas. Não menos importante, a estabilidade proteica dependerá também do tamanho das cavidades nas quais as moléculas de água podem penetrar⁶². Considerando que as enzimas, em sua maioria, são proteínas, os fatores que influenciarão na estabilidade das proteínas farão também com que diferentes enzimas possam assumir comportamentos diferenciados (ativação e inativação) em frente a tratamentos com HHP²¹.

Um bom exemplo, diretamente aplicado à indústria, são as lipases, enzimas amplamente encontradas na natureza que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, liberando glicerol e

ácidos graxos de cadeia longa. Essas enzimas, atualmente, constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para a síntese de biopolímeros e biodiesel. Recentes trabalhos têm demonstrado que a utilização da HHP em lipases pode ser eficaz, pois valores de pressão até 350 MPa aumentam a atividade dessa enzima²¹.

Um outro exemplo, ainda em estudo, é a utilização da acetilcolinesterase sob HHP. É sabido que essa enzima é naturalmente indispensável na transmissão sináptica. Na bioengenharia, é amplamente utilizada em biosensores para detecção de pesticidas, metais e compostos orgânicos. Com a utilização da HHP no aumento e na estabilização da sua atividade, essa enzima pode ser uma boa ferramenta para a aplicação como biosensor em ambientes de alta pressão, o que favorecerá a exploração de óleos e gás natural em oceano profundo²¹.

DESCONTAMINAÇÃO DE ALIMENTOS |

O processamento de alimentos envolve a sinergia entre diferentes processos físicos para transformar a matéria-prima animal/planta em produtos prontos para consumo⁵⁷. Logo, a crescente demanda do consumidor por alimentos minimamente processados, livres de aditivos e estáveis no armazenamento levou à exploração de outros tratamentos físicos, como alternativa em potencial aos tradicionais tratamentos térmicos¹².

A alta pressão hidrostática é uma das mais promissoras tecnologias para tratamento e preservação de alimentos em temperatura ambiente¹³. Para tanto, o processo de preservação por alta pressão promove a redução da carga microbiana para o mesmo nível alcançado pelas tecnologias tradicionais. Esse processo ainda gera produtos de maior qualidade e com dramática redução de aditivos conservantes⁸⁰.

Embora a HHP tenha sido demonstrada como forma de preservação de alimentos por Hite desde 1899⁴², o uso da pressão em sistemas biológicos ficou estagnado por quase 100 anos. Durante esse tempo, essa técnica foi aplicada nos campos da engenharia e na ciência de materiais, o que levou ao desenvolvimento de sensores e equipamentos mais precisos e fáceis de usar e, assim, aumentou a viabilidade da aplicação comercial da HHP na indústria de alimentos⁷¹.

O primeiro produto processado por HHP foi uma geleia de fruta introduzida no mercado japonês em 1990 e, desde então, uma variedade de produtos alimentícios tem sido comercializada por todo o mundo. Diversos trabalhos têm sido publicados, demonstrando a efetividade da utilização

da pressão hidrostática no tratamento para a eliminação e descontaminação de micro-organismos patogênicos. Podem-se ressaltar, como sucesso da técnica, diversos processados de frutas, arroz, carnes, cereais, “guacamole”, frutos do mar, dentre outros⁵³ (Figura 1).

Figura 1 – Exemplos de produtos tratados por alta pressão comercializados nos Estados Unidos²⁰



O tratamento de HHP em alimentos envolve submeter o material alimentício a pressões que geralmente vão de 100 MPa até 1000 MPa⁴. Essa tecnologia reúne várias vantagens já que permite o processamento do alimento à temperatura ambiente ou até mesmo em baixas temperaturas; possibilita a transmitância da pressão por todo o sistema, independente do tamanho e geometria do alimento; causa morte microbiana enquanto elimina virtualmente o dano por calor e o uso de conservantes/aditivos químicos, levando à melhoria da qualidade em geral do alimento. Mais, ainda, o tratamento de HHP pode ser usado para criar alimentos com uma nova propriedade funcional⁶¹.

A conservação da qualidade dos alimentos no processo de descontaminação por HHP está relacionada com o controle de tempo-temperatura-pressão. O controle desses parâmetros causa mínimas mudanças químicas, pois compostos alimentícios de baixo peso molecular, como alguns agentes flavorizantes, pigmento e algumas vitaminas não são significativamente alterados, já que as ligações covalentes não são afetadas pela pressão²⁵. Apesar disso, o tratamento com HHP pode provocar a alteração de macromoléculas responsáveis pela qualidade nutricional dos alimentos. Transformações estruturais das proteínas

alimentares, por exemplo, podem ter um impacto positivo, como o aumento da digestibilidade^{18,81} ou a redução da alergenicidade^{81,82}. A modificação de enzimas sob HHP pode, também, estabilizar a qualidade do alimento, em especial dos “flavours” (por exemplo, com a inativação da lipoxigenase, responsável pela produção de sabores e aromas ruins em vegetais) ou do aspecto (por exemplo, com a inibição das polifenoloxidasas responsáveis pelo escurecimento de frutas e vegetais)¹⁹.

No controle microbiano, a efetividade da HHP também é influenciada por fatores relacionados com os parâmetros do processo, nível de pressão, temperatura, tempo de exposição, assim como por fatores intrínsecos do alimento, como o pH, a cepa e o estágio de crescimento do micro-organismo e da matriz do alimento⁸³. Diversos são os mecanismos de inativação nesse processo, que incluem várias mudanças morfológicas, como compressão de vacúolos gasosos, alongamento da célula, separação da membrana da parede celular, coagulação de proteínas citoplasmáticas, modificações no citoesqueleto, no núcleo e em organelas intracelulares, contração da parede celular com a formação de poros, liberação de constituintes (especialmente os de origem nuclear) para fora da célula, entre outros. A pressão causa algumas desnaturações proteicas na membrana, aumentando sua permeabilidade e alterando a seletividade¹⁴. Além disso, inibe reações energéticas e desnatura enzimas essenciais ao crescimento e à reprodução de micro-organismos¹¹.

Bactérias gram-positivas normalmente são mais resistentes quando comparadas com as gram-negativas sob tratamento com alta pressão. O tratamento com pressão de 500 MPa aplicada por 10 minutos a 20 °C reduz a população de bactérias gram-negativas, como a *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, de seis a sete escalas logarítmicas. Já a população de 10⁶ células/ml de bactéria gram-positiva *Staphylococcus* é inativada a 800 MPa, quando tratada por 10 minutos a 20 °C³⁰.

A maior resistência da forma esporulada das bactérias é a grande dificuldade na utilização da HHP em descontaminação de alimentos, sendo proposta a utilização de mais de um processo, como a associação da pressão com a temperatura, para inativação dos esporos. Por exemplo, foi demonstrado que esporos de *Bacillus cereus* diminuem em um ciclo logarítmico quando submetidos à pressão de 800 MPa por 10min., a 20 °C. Já com uma pressão de 800 MPa, 10min, a 50 °C todos os esporos são destruídos³⁰.

Em geral, leveduras e outros fungos são mais sensíveis à alta pressão do que bactérias vegetativas. Tratamentos

de 220 MPa em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* do tipo selvagem matam todas as células²⁴. *Saccharomyces cerevisiae* é um bom modelo para pesquisas em célula eucariótica. O estudo do estresse de HHP em levedura é uma das ferramentas que possibilita o entendimento e utilização dessa técnica na indústria biotecnológica e em Ciências da Saúde. Diante disso, o tratamento de pressão de 200 MPa por 30min em *Saccharomyces cerevisiae* demonstra uma desorganização do citoesqueleto com o rompimento da ultraestrutura dos microtúbulos, filamentos de actina e membranas nucleares, alterações na estrutura do complexo de Golgi e em mitocôndrias com distribuição anormal dessas no citoplasma e desaparecimento vacuolar²³. Por conseguinte, há a indução e a repressão de uma variedade de genes em resposta ao estresse²², além do envolvimento de mecanismos relacionados com a fluidez da membrana na proteção da célula⁶. Assim, como exemplo de aplicação dessa técnica, o tratamento de pressão hidrostática de 50 MPa por 30min em leveduras antes do processo fermentativo demonstra aumentar a produção de etanol em comparação com células não pressurizadas⁷, confirmando a potencialidade do uso da HHP na produção de biomassa mais adaptada à indústria biotecnológica fermentativa.

Parasitas e vírus também contaminam alimentos¹⁹. Oocistos dos parasitas *Cryptosporidium parvum* ou *Toxoplasma gondii* podem ser facilmente inativados por tratamentos de pressão entre 340 MPa e 550 MPa aplicados por um tempo igual ou menor a três minutos. Já estudos em nematoides, como *Ascaris suum* ou *Anisakis simplex*, demonstraram que uma pressão de aproximadamente 200 MPa aplicada por 10min, é suficiente para inativar esses parasitas⁶². Em vírus, as condições de HHP devem ser determinadas especificamente para cada tipo, já que a resposta e suscetibilidade é heterogênea, da forma severa (por exemplo, hepatite A ou murine norovirus) para a forma ligeiramente atenuada (por exemplo, poliovírus). Da mesma maneira, as condições de alta pressão hidrostática não reproduzem reduções similares em uma mesma família de vírus⁵¹.

Diante do exposto, faz-se necessária a condução de mais pesquisas que viabilizarão novas aplicações ao tratamento por HHP. O desenvolvimento de equipamentos de alta pressão com maior capacidade, mais automatizado, com melhor controle de temperatura, melhor sanitização, mais resistentes e de baixo custo constitui um pré-requisito para se transferir para a prática industrial toda essa potencialidade de aplicação da pressão no campo da tecnologia de alimentos¹⁵. E, além disso, o melhor entendimento das mudanças impostas pela pressão, não

somente no alimento, mas também nos micro-organismos e macromoléculas⁵³. Afinal, o processamento de alimentos usando alta pressão é um método confiável que pode aumentar, por exemplo, o consumo de produtos, como frutas tropicais, por mercados do mundo todo, restritos hoje muitas vezes aos países tropicais e a algumas parcelas de países desenvolvidos⁶⁵. Patentes no mundo todo têm tentado proteger essa tecnologia.

DOENÇAS AMILOIDOGÊNICAS, CÂNCER E APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA |

Nos últimos anos, um número crescente de estudos médicos e biotecnológicos tem focado a habilidade da alta pressão hidrostática em dissociar conjugados proteicos^{17,46}. No tocante à saúde pública, existe um grande interesse em doenças, como as amiloidoses, doenças causadas por agregados fibroproteínicos, que se formam na matriz extracelular, associados a diversas doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, Parkinson e encefalopatia espongiforme bovina, também conhecida como “doença da vaca louca”^{17,29,54}. Esta última envolve a proteína príon que se converte da forma celular, PrP^c, para a chamada isoforma, PrP^{sc}, a entidade infecciosa que pode causar uma variação da doença em humanos, a doença de Creutzfeldt-Jakob¹⁶.

Essas fibrilas amiloides são extremamente resistentes ao calor, mas a combinação de alta temperatura (60 °C) e alta pressão (>500 MPa) torna a isoforma PrP^{sc} significativamente menos infectante e menos resistente à atividade da proteinase K. Tal diminuição, provavelmente, é causada pela dissociação dos agregados infecciosos^{26,40}. Num estudo similar, foi examinado o efeito de pulsos de pressão na faixa de 690-1200 MPa a temperaturas de 121-137 °C sob carne processada contaminada com o príon PrP^{sc}⁸. Mais uma vez, foi reportada uma redução significativa na infectividade dos príons, sugerindo que um tratamento que combine alta pressão e alta temperatura poderia produzir uma carne processada segura para comercialização.

A HHP também vem sendo relacionada com pesquisas do câncer. O desenvolvimento de drogas e peptídeos que imitam a função ou que restabelecem a conformação nativa de proteínas supressoras de tumor, como a p53, está entre as muitas estratégias de combate ao câncer^{10,31}. Para tanto, faz-se necessário compreender as bases moleculares que levam ao dobramento correto e à estabilidade da conformação nativa da p53, a fim de entender por que algumas mutações, ou até mesmo

algumas conformações alternativas da proteína do tipo selvagem, podem levar à perda da função da proteína e, portanto, ao aparecimento de tumores⁶⁷.

Estudos recentes, por ressonância magnética nuclear, demonstraram um estado desnaturado e não agregado alternativo da proteína p53 selvagem a temperaturas abaixo de 0 °C e alta pressão semelhante ao encontrado em formas mutantes sabidamente cancerígenas¹⁷. Essa conformação alternativa provavelmente está relacionada com formas inativas que aparecem *in vivo*, geralmente conduzidas pela interação com proteínas mutantes. Pode, portanto, ser um bom alvo na busca de maneiras de como evitar o incorreto envelhecimento proteico e, dessa forma, o desenvolvimento de tumores⁴⁴.

Os mecanismos, a termodinâmica e a cinética por trás da agregação proteica, bem como a relação entre as vias de agregação e envelhecimento permanecem ainda muito incertos³⁸.

Nesse contexto, a pressão hidrostática pode servir como ferramenta promissora na elucidação dos processos de envelhecimento e agregação e como base para o desenvolvimento de metodologias que visem à elucidação das vias envolvidas com doenças, como o câncer e as doenças amiloidogênicas, e, também, de alternativas de tratamento mais eficientes e menos invasivos que os atuais, de modo a promover a qualidade de vida dos enfermos.

Outro aspecto importante a ser considerado é a agregação resultante da superexpressão de proteínas recombinantes (por exemplo, a insulina recombinante humana), que acarreta uma diminuição na eficiência e na qualidade dos produtos farmacêuticos, um problema recorrente encontrado pela indústria farmacêutica³⁹. Nesse contexto, a aplicação da pressão mostra-se como uma boa alternativa para contornar o problema recorrente e aumentar a qualidade e a eficiência na produção de fármacos.

INATIVAÇÃO DE VÍRUS E PRODUÇÃO DE VACINAS |

Os métodos tradicionais de inativação viral para o desenvolvimento de vacinas consistem em expor os vírus a produtos químicos tóxicos (Ex.: formalina, etilenamina binária) ou irradiação, podendo levar à degradação intrínseca do epítipo e, conseqüentemente, à baixa imunogenicidade⁴⁵.

Algumas vacinas existentes no mercado são produzidas com o vírus atenuado e, em sua grande maioria, são sensíveis

à temperatura. Dentre elas está a vacina oral polivalente contra poliomielite (OPV), uma formulação líquida composta por uma única cepa atenuada de cada um dos três sorotipos, que é atualmente utilizada em vários países para a prevenção dessa doença^{66,72,77}. A OPV é sensível ao calor, portanto deve ser armazenada em baixas temperaturas e utilizada imediatamente após o descongelamento, para assegurar uma imunização eficaz²⁷.

Devido à sua capacidade de dissociar as proteínas oligoméricas de maneira reversível, o tratamento com HHP moderada tem se tornado de grande interesse, como método alternativo para a inativação de vírus no desenvolvimento de vacinas. O tratamento de pressão preserva importantes epítomos estruturais dos vírus, permitindo que partículas tratadas levem a uma resposta imunológica adequada^{32,45,48}. Além disso, os produtos tratados podem expor epítomos anteriormente ocultos, aumentando ainda mais a imunogenicidade³⁴.

Após tratamento de alta pressão, a estrutura global do vírus não é alterada, e a única diferença perceptível com as observações por microscopia eletrônica é a presença de uma protuberância na superfície, que pode ser explicada por um deslocamento das subunidades do capsídeo que ficam retidas sob a membrana lipídica e proteica^{32,68}.

Uma hipótese sugere que, durante o tratamento com HHP, podem ocorrer sutis mudanças conformacionais nas proteínas e ou glicoproteínas do envoltório viral, imitando o processo de ligação das partículas virais aos receptores celulares do hospedeiro, sendo esse processo conhecido como “estado de fusão ativo”^{72,33}. A transição para o estado de fusão ativo impede a ligação do vírus aos seus receptores celulares, prevenindo assim a endocitose e a infecção viral⁵⁸.

A maioria dos estudos realizados até o momento foram com vírus envelopados. Nesse caso, a HHP pode afetar três tipos de interação: proteína-lipídeo, proteína-proteína e proteína-ácido nucleico. A última interação parece permanecer intacta sobre alta pressão³³. Vírus não envelopados são geralmente mais resistentes à pressão. O estado de fusão descrito para os vírus envelopados pode ser também encontrado em vírus não envelopados inativados, por pressão^{58,75}.

A inativação dos vírus é frequentemente aumentada quando um tratamento com alta pressão é aplicado em baixas temperaturas. Sob essas condições, as proteínas podem sofrer desnaturação a frio, devido a uma desestabilização sinérgica das pontes de hidrogênio e à hidratação dos grupos hidrofóbicos, levando à perda das estruturas

quaternária e terciária^{9,50}.

A literatura relata que uma HHP de 250 MPa a uma temperatura de -15 °C, juntamente com ureia na concentração de 1 M, é capaz de abolir completamente a infectividade do vírus icosaédrico da febre aftosa, sem quaisquer efeitos deletérios sobre a estrutura do capsídeo⁴⁵. De forma semelhante, uma suspensão do vírus da febre amarela (cepa 17DD, em aproximadamente 107 unidades/ml) foi completamente inativada após três horas de tratamento com 310 MPa a 4° C⁶⁷. Otake e colaboradores, em 2005⁵⁹, utilizando o método de geração de pressão por congelamento, conseguiram abolir a infectividade de cepas laboratoriais do vírus HIV tipo 1 com uma pressão de 200 MPa.

Enquanto o foco da maioria dos trabalhos com o uso da HHP em vírus é direcionado para a inativação viral e a produção de vacinas, existem projetos que buscam, por meio de ensaios com HHP, a estabilização de vacinas sensíveis ao calor. Em 2009, Ferreira e colaboradores²⁷ mostraram que a HHP estabiliza poliovírus contra inativação por calor (mesmo na ausência de termoestabilizadores), sugerindo fortemente esse método de tratamento como um estabilizador potencial para a vacina.

Uma dificuldade em se utilizar a HHP em trabalhos com vírus é que o impacto dessa técnica se torna muito variável⁴⁸. O nível de inativação das partículas virais depende de vários fatores, incluindo a estrutura do vírus, o nível de pressão, a temperatura, o pH, entre outros^{36,37,43,49,74}.

Comparadas com as preparações tradicionais de vacina, as vacinas produzidas por alta pressão representam muitas vantagens, incluindo um menor risco de se desenvolver a doença (quanto comparadas com as vacinas atenuadas), e provavelmente uma maior imunidade que as subunidades isoladas⁶³.

Outra estratégia desenvolvida para a construção de vacinas é o uso de fantasmas bacterianos (envelope celular ausente de conteúdo citoplasmático) ao invés de micro-organismos mortos ou atenuados. Os fantasmas bacterianos são geralmente obtidos pela expressão de um gene de lise. A expressão desse gene leva à formação de uma estrutura em forma de túnel na região transmembrana da bactéria e, conseqüentemente, ocorre o vazamento dos constituintes celulares. Essas entidades retêm suas propriedades imunogênicas desde que sua superfície celular permaneça intacta. O tratamento com alta pressão pode ser uma alternativa interessante para a produção de fantasmas bacterianos. De fato, foi demonstrado que a

superexpressão da proteína Mrr de *E. coli* K12 conferiu uma hipersensibilidade da célula ao tratamento por alta pressão, e essas células são totalmente inativadas com um tratamento de 100 MPa por 15min a 20 °C. Além disso, a bactéria morta por esse tratamento (pela atividade da proteína Mrr) reteve suas estruturas celulares e não foi lisada ou permeabilizada, ao contrário dos fantasmas bacterianos preparados pela expressão do gene de lise. Essa última característica representa uma vantagem para os fantasmas bacterianos obtidos pela pressão, que podem ser usados como veículos de entrega para subunidades ou vacinas de DNA sem a necessidade de serem artificialmente ligados à membrana (forma comumente usada nos tratamentos tradicionais)⁷⁶.

CONCLUSÃO |

O tratamento com pressão hidrostática produz efeitos únicos nos sistemas sob os quais é empregado, podendo, inclusive, levar à formação de produtos com novas propriedades funcionais. O grande potencial e aplicabilidade dessa técnica em diferentes campos torna seu estudo extremamente atrativo para pesquisadores de diversas áreas (saúde, indústria alimentícia em geral, bioengenharia de tecidos vegetais e animais, pesquisa básica, entre outras). Devido ao extenso leque de atuação e aos resultados característicos obtidos com o estudo da HHP, ainda há muito para ser explorado nessa área. Como vimos, a pressão é um parâmetro termodinâmico e o seu controle para uso da humanidade requer o esforço conjunto de biólogos, físicos, engenheiros metalúrgicos, de materiais, de alimentos, agrônomos, farmacêuticos, médicos, *designer* de equipamentos, entre outros profissionais. Esse grande esforço conjunto é a alma da Biotecnologia.

REFERÊNCIAS |

- 1 - Abe F. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from Piezophysiology. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71 (10): 2347-57.
- 2 - Aertsen A, Meersman F, Hendrickx MEG, Vogel R e Michiels CW. Biotechnology under high pressure: applications and implications. *Trends Biotechnol* 2009; 27: 434-41.
- 3 - Balasubramaniam VM, Farkas D, Turek EJ. Preserving foods through high-pressure processing. *Food Technology* 2008; 62 (11): 32-8.
- 4 - Balny C, Masson P, Heremans K. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1595: 3-10.
- 5 - Boonyaratankornkit BB, Park CB, Clark DS. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595: 367-81.
- 6 - Bravim F, de Freitas JM, Fernandes AAR, Fernandes PMB. High hydrostatic pressure and the cell membrane. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1189: 127-32.
- 7 - Bravim F, Palhano FL, Fernandes AAR, Fernandes PMB. Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; 37: 1071-9.
- 8 - Brown P, Meyer R, Cardone F, Pocchiari M. Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: a practical method to prevent human infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6093-7.
- 9 - Buckow R, Isbarn S, Knorr D, Heinz V, Lehmachner A. Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74:1030-8.
- 10 - Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nature Rev Cancer* 2001; 1: 68-76.
- 11 - Calderón-Miranda ML, González MFSM, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: variables e inactivación microbiana. *Braz J Food Technol* 1998; 1: 3-11.
- 12 - Campos FP, Dousualdo GL, Cristianini M. Utilização da tecnologia de alta pressão no processamento de alimentos. *Braz J Food Technol* 2003; 6 (2): 351-7.
- 13 - Cheftel JC. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: An overview. In: Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P, editors. High pressure and biotechnology. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd; 1992. p. 195-209.
- 14 - Cheftel JC. Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol Int* 1995; 1 (2/3): 75-90.
- 15 - Coelho VLG. Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos. *Rev Univ Rural, Sér Ciênc Exatas e da Terra* 2002; 21 (1): 105-10.
- 16 - Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 2007; 318: 930-6.

- 17 - Cordeiro Y, Kraineva J, Gomes MPB, Lopes MH, Martins VR, Lima LMTR, Foguel D, Winter R, Silva JL. The amino-terminal PrP domain is crucial to modulate prion misfolding and aggregation. *Biophys J* 2005; 89: 2667-76.
- 18 - Dan S, Shujun L, Laurie HM, Fengmin Z, Lanfang Z, Xiaopeng Z, Wei L, Youfu C. Effects of high hydrostatic pressure on in vitro digestion of soy protein. *Intl Agric Eng J* 2010; 19: 49-58.
- 19 - Demazeau G, Rivalain N. The development of high hydrostatic pressure processes as an alternative to other pathogen reduction methods. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 1359-69.
- 20 - Nitzke JA. Processamento de alimentos com alta pressão – UHP; 2011 [citado 2011 ago 12]. Disponível em: URL: <<http://www.ufrgs.br/alimentos/ita02014/htm/altapressao.html>>.
- 21 - Einsenmenger M J, Reyes-De-Corcuera J I. High Pressure enhancement of enzyme: a review. *Enz Mic Tech* 2009; 45: 331-47.
- 22 - Fernandes PMB, Domitrovic T, Kao CM, Kurtenbach E. Genome expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Lett* 2004; 556: 153-60.
- 23 - Fernandes PMB, Farina M, Kurtenbach E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Let Appl Microbiol* 2001; 32 (1): 42-6.
- 24 - Fernandes PMB. How does yeast respond to pressure? *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(8): 1239-45.
- 25 - Fernandes PMB, Panek AD, Kurtenbach E. Effect of hydrostatic pressure on a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* deleted in the trehalose-6-phosphate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 152 (1): 17-21.
- 26 - Fernández García A, Heindl P, Voigt H, Büttner M, Wienhold D, Butz P, Stärke J, Tauscher B, Pfaff E. Reduced proteinase K resistance and infectivity of prions after pressure treatment at 60°C. *J Gen Virol* 2004; 85: 261-4.
- 27 - Ferreira E, Mendes YS, Silva JL, Gallera R, Oliveira AC, Freire MS, Gaspara LP. Effects of hydrostatic pressure on the stability and thermostability of poliovirus: a new method for vaccine preservation. *Vaccine* 2009; 27: 5332-7.
- 28 - Foguel D, Silva JL. Cold denaturation of a repressor-operator complex: the role of entropy in protein-DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8244-7.
- 29 - Foguel D, Suarez MC, Ferrão-Gonzales AD, Porto TCR, Palmieri L. Dissociation of amyloid fibrils of alpha-synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9831-6.
- 30 - Fonberg-Broczek M, Arabas J, Porowski S, Podlasin S, Szczepek J, Windyga B, Sciezynska H, Gorecka K, Grochowska A, Karlowski K, Jurczak J, Salanski P. The effect of ultra high hydrostatic pressure on vegetative microorganisms and spores of chosen bacteria and moulds. *Process Optimisation and Minimal Processing of Foods: High Pressure* 1996; 4: 46-50.
- 31 - Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 1999; 286: 2507-10.
- 32 - Gaspar LP, Mendes YS, Yamamura AM, Almeida LF, Caride E, Gonçalves RB, et al. Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: implications for vaccine development. *J Virol Methods* 2008; 150: 57-62.
- 33 - Gaspar LP, Silva ACB, Gomes AMO, Freitas MSAPD, Schwarcz WD, et al. Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses. *J Biol Chem* 2002; 277: 8433-9.
- 34 - Girard E, Kahn R, Mezouar M, Dhaussy AC, Lin T, Johnson JE, Fourme R. The first crystal structure of a macromolecular assembly under high pressure: CpMV at 330 MPa. *Biophys J* 2005; 88: 3562-71.
- 35 - Girard E, Prange T, Dhaussy AC, Migianu-Griffoni E, Lecouvey M, Chervin JC, Mezouar M, Kahn R, Fourme R. Adaptation of the base-paired double-helix molecular architecture to extreme pressure. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 4800-8.
- 36 - Grove SF, Forsyth S, Wan J, Coventry J, Cole M, Stewart CM, Lewis T, Ross T. et al. Inactivation of hepatitis a virus, poliovirus and a norovirus surrogate by high pressure processing. *Innov Food Sci Emerg* 2008; 9: 206-10.
- 37 - Grove SF, Lee A, Lewis T, Stewart CM, Chen HQ, Hoover DG. Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. *J Food Protect* 2006; 69: 957-68.
- 38 - Grudzielanek S, Smirnovas V, Winter R. Solvation-assisted pressure tuning of insulin fibrillation: from novel aggregation pathways to biotechnological applications. *J Mol Biol* 2006; 356: 497-509.

- 39 - Harper JD, Lansbury Jr PT. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 385-407.
- 40 - Heindl P, Fernández García A, Butz P, Trierweiler B, Voigt H, Pfaff E, Tauscher B. High pressure/temperature treatments to inactivate highly infectious prion subpopulations. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2008; 9: 290-7.
- 41 - Heremans KAH. High pressure effects upon proteins and other biomolecules. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1982; 11: 1-21.
- 42 - Hite B. The effect of pressure in the preservation of milk. *Bull West Virginia University. Agr Exp Sta* 1899; 58: 15-35.
- 43 - Isbarn S, Buckow R, Himmelreich A, Lehmacher A, Heinz V. Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure. *J Food Protect* 2007; 70: 667-73.
- 44 - Ishimaru D, Maia LF, Maiolino LM, Quesado PA, Lopez PC, Almeida FC, Valente AP, Silva JL. Conversion of wild-type p53 core domain into a conformation that mimics a hot-spot mutant. *J Mol Biol* 2003; 333: 443-51.
- 45 - Ishimaru D, Sá-Carvalho D, Silva JL. Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine. *Vaccine* 2004; 22: 2334-9.
- 46 - Jansen R, Grudzielanek S, Dzwolak W, Winter R. High Pressure promotes circularly shaped insulin amyloid. *J Mol Biol* 2004; 338: 203-6.
- 47 - Jonas J. High-resolution nuclear magnetic resonance studies of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595: 145-59.
- 48 - Jurkiewicz E, Villas-Boas M, Silva JL, Weber G, Hunsmann G, Clegg RM. Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6935-7.
- 49 - Kingsley DH, Chen HQ. Influence of pH, salt, and temperature on pressure inactivation of hepatitis A virus. *Int J Food Microbiol* 2009; 130: 61-64.
- 50 - Kingsley DH, Holliman DR, Calci KR, Chen H, Flick GJ. Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 581-5.
- 51 - Kovac K, Diez-Valcarce M, Hernandez M, Raspor P, Rodriguez-Lazaro D. High hydrostatic pressure as emergent technology for the elimination of foodborne viruses. *Trends Food Sci Technol* 2010; 21: 558-68.
- 52 - Lange R, Balny C. UV-visible derivative spectroscopy under high pressure. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595: 80-93.
- 53 - Lopes MLM, Valente Mesquita VL, Chiaradia, ACN, Fernandes AAR, Fernandes PMB. High hydrostatic pressure processing of tropical fruits. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1189: 6-15.
- 54 - Meersman F, Dobson CM. Probing the pressure temperature stability of amyloid fibrils provides new insights into their molecular properties. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 452-60.
- 55 - Mentré P, Hui Bom Hoa G. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule – associated water. *Int Ver of Cytol* 2001; 201: 1-84.
- 56 - Molina-Garcia AD. The effect of hydrostatic pressure on biological systems. *Biotech Gen Eng Rev* 2002; 19: 3-53.
- 57 - Norton T, Sun DW. Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food Bioprocess Tech* 2008; 1: 2-34.
- 58 - Oliveira AC, Gomes AMO, Lima SMB, Gonçalves RB, Schwarcz WD, Silva ACB, et al. Effects of hydrostatic pressure on viruses. In: Michiels CW, editor. *High pressure microbiology*. Washington: ASM; 2008. p. 19-34.
- 59 - Otake T, Kawahata T, Mori H, Kojima Y, Hayakawa K. Novel method of inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by the freeze pressure generation method. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 67: 746-51.
- 60 - Palhano FL, Gomes HL, Orlando MT, Kurtenbach E, Fernandes PM. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. *Cell Mol Biol* 2004; 50(4): 447-57.
- 61 - Pereira RN, Vicente AA. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Res Intern* 2010; 43 (7): 1936-43.
- 62 - Rivalain N, Roquain J, Demazeau G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies. *Biotechnol Adv* 2010; 28: 659-72.
- 63 - Royer CA. Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595: 201-9.

- 64 - Ruan K, Balny C. High pressure static fluorescence to study macromolecular structure-function. *Biochim Biophys Acta*; 1595: 94-102.
- 65 - Santos RV. A pressão hidrostática como uma moderna ferramenta biotecnológica [Monografia]. Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Humanas e Naturais: Universidade Federal do Espírito Santo; 2010.
- 66 - Shiomi H, Urasawa T, Urasawa S. Heat stability of the lyophilized Sabin polio vaccine. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56 (2): 70-2.
- 67 - Silva JL, Foguel D, Suarez M, Gomes AMO e Oliveira AC. High-pressure applications in medicine and pharmacology. *J Phys: Condens. Matter* 2004; 16: 929-44.
- 68 - Silva JL, Luan P, Glaser M, Voss EW, Weber G. Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *J Virol* 1992; 66: 2111-7.
- 69 - Silva JL, Oliveira AC, Gomes AMO, Lima LMTR, Mohana-Borges R, Pacheco ABF, Foguel D. Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595: 250-65.
- 70 - Silva JL, Weber P. Pressure stability of proteins. *Ann Rev Phys Chem* 1993; 44: 89-113.
- 71 - Smelt JPPM. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci Technol* 1998; 9: 152-8.
- 72 - Sokhey J, Gupta CK, Sharma B, Singh H. Stability of oral polio vaccine at different temperatures. *Vaccine* 1988; 6: 12-3.
- 73 - Somero GN. Adaptations to High Hydrostatic Pressure. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 57-577.
- 74 - Terio V, Tantillo G, Martella V, Di Pinto P, Buonvoglia C, Kingsley DH. High pressure inactivation of HAV within mussels. *Food Env Virol* 2010; 2: 83-8.
- 75 - Tian SM, Ruan KC, Qian JF, Shao GQ, Balny C. Effects of hydrostatic pressure on the structure and biological activity of infectious bursal disease virus. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4486-94.
- 76 - Vanlint D, Mebhratu MT, Michiels CW, Aertsen A. Using mild high-pressure shock to generate bacterial ghosts of *Escherichia coli*. *Z Naturforsch B* 2008; 63: 765-8.
- 77 - Wallis C, Melnick JL. Cationic stabilization: a new property of enteroviruses: a new property of enteroviruses. *Virology* 1962; 16: 504-5.
- 78 - Winter R, Dzwolak W. Exploring the temperature-pressure configurational landscape of biomolecules: from lipid membranes to proteins. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2005; 363: 537-63.
- 79 - Winter R. Synchrotron X-ray and neutron small-angle scattering of lyotropic lipid mesophases, model biomembranes and proteins in solution at high pressure. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1595: 160-84.
- 80 - Yaldagard M, Mortazavi SA, Tabatabaie F. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *Afr J Biotechnol* 2008; 7 (16): 2739-67.
- 81 - Yamamoto S, Mikami N, Matsuno M, Hara T, Odani S, Suzuki A, Nishiumi T. Effects of a high-pressure treatment of bovine gamma globulin and its reduction in allergenicity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 525-30.
- 82 - Zeece M, Huppertz T, Kelly A. Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of beta-lacto-globulin. *Innov Food Sci Emerg* 2008; 9: 62-9.
- 83 - Zhou GH, Xu XL, Liu Y. Preservation technologies for fresh meat-A review. *Meat Science* 2010; 86: 119-28.
- 84 - Zimmerman AM. High pressure studies in cell biology. *Int Rev Cytol* 1971; 30: 1-47.

Correspondência para/ Reprint request to:
Patricia Machado Bueno Fernandes
Núcleo de Biotecnologia, CCS, UFES
Av. Marechal Campos, nº 1468
Maruipé Vitória - ES
CEP: 29040-090
e-mail: patricia.fernandes@pq.cnpq.br