

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE

AVALIAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA
SOBRE A QUALIDADE DE FILÉ DE SARDINHA
BRASILEIRA

FABIANO ALVES DE OLIVEIRA

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE A
QUALIDADE DE FILÉ DE SARDINHA BRASILEIRA**

FABIANO ALVES DE OLIVEIRA

Sob Orientação do Professor
Dr Amauri Rosenthal

e Co-orientação da Professora
Dr^a Elisa Helena Rocha Moreira

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Tecnologia de Alimentos.

Seropédica, RJ
Janeiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48a Oliveira, Fabiano Alves de , 1982-
Avaliação da alta pressão hidrostática sobre a
qualidade de sardinha brasileira / Fabiano Alves de
Oliveira. - 2018.
139 f.: il.

Orientador: Amauri Rosenthal.
Coorientadora: Elisa Helena Rocha Moreira.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, 2018.

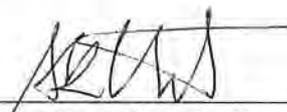
1. Isostático. 2. Armazenamento. 3. Sardinella
brasiliensis. 4. Nucleotídeos. I. Rosenthal, Amauri,
1960-, orient. II. Moreira, Elisa Helena Rocha, -,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

FABIANO ALVES DE OLIVEIRA

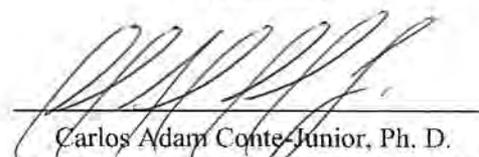
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Tecnologia de Alimentos

Tese Aprovada em 16/01/2018



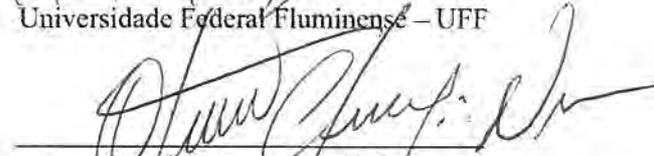
Amauri Rosenthal, Ph. D.

Embrapa Agroindústria de Alimentos
(Orientador)



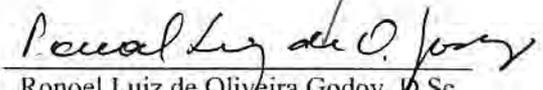
Carlos Adam Conte Junior, Ph. D.

Universidade Federal Fluminense – UFF



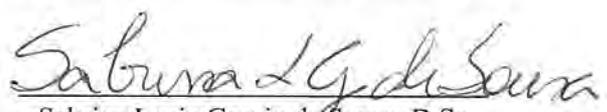
Otávio Cabral Neto, D Sc

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins – IFTO



Ronoel Luiz de Oliveira Godoy, D Sc

Embrapa Agroindústria de Alimentos



Sabrina Luzia Gregio de Sousa, D Sc

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

DEDICATÓRIA

*Dedico essa pesquisa àqueles que são
as grandes razões do meu dia-a-dia:*

Meus pais Maria (in memorian) e Mozart,

Meu irmão Fernando e família,

Meu irmão Fabrício e família,

Meu amor Lígia e meus filhos Daniel e Manuela.

*À minha mãe, pela vida de exemplos e superação,
pela constante presença espiritual em minha vida,
dedico título de Doctor Scientiae.*

*Ao meu grande amor Lígia Marcondes,
dedico essa tese.*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por colocar em toda minha carreira e, em especial nessa fase de doutoramento, pessoas e instituições que tanto agregaram pessoalmente, profissionalmente e academicamente.

Ao meu orientador Amauri Rosenthal pela acolhida no grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos e trocas de experiências profissionais e pessoais, pela confiança no meu potencial, pelo estímulo ao meu desenvolvimento, e por se manter humano em um meio científico frio e competitivo. Agradeço a compreensão, apoio e dedicação a essa pesquisa, e manifesto aqui a mais profunda gratidão de ter desenvolvido essa tese sob sua orientação.

Agradeço a minha co-orientadora Elisa Helena Rocha Ferreira pelas contribuições para desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço ao amigo Otávio Cabral pela empolgação e incentivo para desenvolvimento da ideia do doutorado e dos trabalhos de pesquisa.

Agradeço ao Carlos Conte pelas importantes contribuições para consolidação dessa tese ao colocar à disposição toda sua experiência, disponibilidade e interesse em contribuir. Oportunamente, agradeço à equipe de técnicos e estudantes sob sua supervisão, em especial Maria Lúcia Monteiro e Fernanda Viana, que contribuíram para realização de algumas análises.

Agradeço ao Ronoel Godoy pelo acolhimento no laboratório, bom humor, profissionalismo e dedicação dispensada no ajuste das últimas análises dessa pesquisa. Junto com Sidney Pacheco, foram incansáveis no ajuste dos métodos e na construtiva missão de me ensinar princípios de cromatografia. Oportunamente, agradeço a toda equipe de estagiários do laboratório pelo apoio, em especial a Géssica Silva pela dedicação às minhas análises.

Agradeço a Sabrina Gregio pelo interesse e disponibilidade em participar desse projeto compondo banca de defesa e pelas importantes contribuições para melhoria da versão final da tese.

Agradeço a Rosires Deliza pelas discussões técnicas e orientações estatísticas, para o tratamento do dados.

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela acolhida e aos professores e técnicos do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por todos os ensinamentos e oportunidades de troca de conhecimento.

Agradeço à Embrapa Agroindústria de Alimentos pela acolhida e pela oportunidade vivenciar um ambiente de uma instituição de pesquisa de alto desempenho. Agradeço aos pesquisadores, analistas, técnicos e estagiários pelas contribuições no desenvolvimento das análises, cessão de equipamentos e instrumentos, e troca de conhecimento. Em especial ao William por todo apoio nas pressurizações.

Agradeço ao Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca – Cefet / RJ, em especial ao colegiado de Engenharia de Alimentos do *campus* Valença, pela liberação para ingresso no programa de doutorado. Adicionalmente, agradeço Plínio Martinho e Mariana Pragana pelo apoio na realização de diversas análises.

Agradeço à Cooperativa de Pesca de Angra dos Reis – PROPESCAR pelo fornecimento das sardinhas utilizadas nos experimentos.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos sólidos e avançados conhecimentos construídos ao longo da graduação e mestrado que possibilitaram desenvolver essa pesquisa com a segurança e olhar crítico indispensável para construção de uma tese de doutorado.

Agradeço aos amigos sem os quais o caminho teria sido muito mais difícil, como Fernando Morais, Amanda Martins, Leandro Capatto, Rosiane Bonfim, Sheila Gonçalves, Fabíola Gouvea, Paola Ervati.

Agradeço ao Antônio Tavares, que muito contribuiu para meu amadurecimento pessoal e profissional quando atuamos na mesma equipe do Centro de Tecnologia SENAI/RJ – Alimentos e Bebidas, e pelo estímulo para que eu ingressasse no doutorado.

Agradeço toda minha família pela compreensão dos diversos momentos no qual estive ausente. Em especial, meu amor, Lígia Marcondes, pelo apoio incondicional e por cuidar tão bem da nossa família, por ser mãe e pai do nosso filho Daniel nos momentos que não estive presente.

BIOGRAFIA

A tese apresentada é resultado do encontro de pesquisadores com notória experiência e conhecimento nos dois principais pilares da pesquisa: processamento de sardinha e processamento de alimentos por alta pressão.

O orientado Fabiano Alves de Oliveira, Engenheiro de Alimentos e título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, e é professor efetivo do Cefet / RJ *campus* Valença onde também atua como diretor de *campus* (2015-2019). Possui experiência sobre o processamento de sardinha por ocasião de ter exercido profissionalmente assessoria técnica a diversas indústrias processadoras nacionais. Com maior frequência, acompanhou e avaliou processos térmicos na elaboração de conservas (produto esterilizado termicamente) tendo atuado em todas as fases do processo, desde a recepção da matéria prima até a expedição do produto final, com maior ênfase na avaliação de esterilização térmica (cálculo de F_0 e dimensionamento de processos). Dessa experiência, transporta para essa tese o conhecimento sobre o quão danoso a aplicação excessiva de calor pode ser para qualidade final do produto processado, o que infelizmente é observado com alguma frequência. Com olhar crítico sobre essa questão, contribuiu na construção dessa tese com a busca por um processamento alternativo de sardinha que seja menos agressivo à qualidade do peixe e que seja inovador.

O orientador dessa tese, Dr. Amauri Rosenthal, Engenheiro de Alimentos e Doutor em Food Biotechnology and Bioengineerin, é pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos atuando na área de processamento não térmico de alimentos, com ênfase em processamento por alta pressão hidrostática. Lidera grupo de pesquisa que orientou diversas pesquisas em níveis de mestrado, doutorado e pós-doutorado com publicação dos resultados nas mais conceituadas revistas científicas internacionais, além de atuar em parceria com grupos de pesquisa de excelência mundial reconhecida na área. Com cerca de 20 anos atuando no processamento por alta pressão, diversas matrizes foram objeto de estudo, como sucos de frutas, carnes, produtos cárneos derivados, leite, produtos lácteos derivados, entre outros. Há alguns anos, com a mundial disseminação da tecnologia e busca por novos desafios para o grupo de pesquisa, iniciaram-se discussões acerca do processamento de pescados por alta pressão que culminaram com o desenvolvimento dessa tese de doutorado. Atualmente, além dessa, outras pesquisas vêm sendo realizadas na mesma linha com outros pescados.

A pesquisa ainda contou com a co-orientação da Dr^a. Elisa Helena Rocha Ferreira, Engenheira de Alimentos e Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, e professora adjunta da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. É pesquisadora atuante na área de processamento de alimentos, com ênfase em processamento por alta pressão e tratamento térmico. Possui resultados de suas pesquisas, realizadas na planta piloto de Alta Pressão da Embrapa e na Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal), publicados nas principais revistas internacionais especializadas. Conhecedora também do processo térmico de processamento de sardinha, e dos eventuais danos que esse processo pode causar a produto final, trouxe para essa tese olhar investigativo na busca de avaliação do processamento inovador.

De maneira a compor um grupo de pesquisa de excelência, esse projeto contou ainda com apoio de outros integrantes cuja experiência contribuiu para aperfeiçoamento dessa tese. Entre eles, figuram os seguintes pesquisadores apresentados em ordem alfabética:

- Dr^a Adriana Slongo, Inst. Fed. Fluminense – IFF;
- Dr^a Ana Lúcia Vendramini, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ;
- Dr André Fioravante Guerra, Cefet / RJ campus Valença;
- Dr^a Caroline Melingher, EMBRAPA Agroindústria de Alimentos;
- Dr Carlos Conte, Universidade Federal Fluminense – UFF;
- Dr^a Gesilene Mendonça, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ;
- Dr Otávio Cabral Neto, Inst. Fed. de Educação Tecnológica do Tocantins – IFTO;
- Dr Ronoel Godoy, EMBRAPA Agroindústria de Alimentos
- Dr^a Rosires Deliza, EMBRAPA Agroindústria de Alimentos;
- Dr^a Sabrina Gregio, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ;
- Dr Sidney Pacheco, EMBRAPA Agroindústria de Alimentos

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Fabiano Alves. **Avaliação da alta pressão hidrostática sobre a qualidade de filé de sardinha brasileira**. 2018, p 121. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Sardinha é um dos principais gêneros de peixes capturados no mundo, e no Brasil, e em particular no estado do Rio de Janeiro, a sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) representa a mais importante espécie comercializada. Apesar de ser amplamente consumido no país, exibe vida curta na forma fresca refrigerada, com progressivas alterações indesejáveis ainda nesse período. Apesar de sua importância comercial e social, nenhum processo inovador de processamento com objetivo de aumentar a vida de prateleira foi desenvolvido nas últimas décadas. Diante disso, o objetivo dessa tese foi avaliar os efeitos da Alta Pressão Hidrostática (APH) sobre qualidade de sardinha. Apesar de a aplicação dessa tecnologia em peixes já ocorrer em escala industrial em todo o mundo, efeitos desejáveis ou adversos podem ocorrer em intensidade altamente específica para cada peixe, e não há informação científica relevante em sardinhas. O **Capítulo I** faz abordagem introdutória sobre sardinha e APH. O **Capítulo II** aprofunda discussão sobre os efeitos da APH em pescados em geral, trazendo à luz da discussão os principais resultados de pesquisas científicas sobre o assunto central. No **Capítulo III** são apresentados resultados experimentais da aplicação de 100, 200, 300 ou 400 MPa por 0 ou 15 min em sardinha. O aumento da intensidade da APH causou clareamento progressivo e discreto aumento de pH. A força de cisalhamento e drip de pressão exibiu efeito varável de acordo com nível de APH. Concluiu-se que os tratamentos 300 MPa / 0 min, 400 MPa / 0 min, 200 MPa / 15 min e 300 MPa / 15 min exibiram efeitos de maior similaridade com o controle (sardinha fresca, não pressurizada). O **Capítulo IV** avaliou os efeitos desses níveis de APH sobre qualidade física e química de sardinhas durante o armazenamento (21 dias, 5°C). Foi demonstrado que a APH exibe potencial para: 1) atenuar a redução da força de cisalhamento; 2) reverter, ainda que parcialmente, o aumento de L^* e redução de a^* causada pela própria APH no dia 0; 3) estabilizar o drip de pressão a 300 Pa / 15 min; e 4) não houve catálise de oxidações de proteínas ou de lipídios, principalmente, até os 14 dias de armazenamento. Concluiu-se não haver limitações para o processamento de sardinha, nos níveis avaliados, no que se refere aos principais efeitos sobre qualidade física e química. O **Capítulo V** avaliou os efeitos da APH sobre formação de compostos nitrogenados (TMA e N-BVT) e degradação de nucleotídeo, tradicionais indicadores de degradação de peixes. Observou-se que a APH inibiu a formação de TMA e N-BVT, modificou o perfil de degradação de nucleotídeos, promovendo acúmulo de IMP e inibindo formação de HxR e Hx, consequentemente retardando aumento do valor K (principalmente 300 MPa / 15 min). Esses resultados sugerem que a APH exibe potencial para estabilização da qualidade durante o período de armazenamento.

Palavras chave: isostático, peixe, autólise, armazenamento, nucleotídeos.

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Fabiano Alves. **Assessment of High Pressure Processing on quality of brazilian sardine fillet.** 2018, p 121. Thesis in Food Science and Technology. Institute of Technology, Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2018.

Sardine is one of the main genera of fish caught in the world, and in Brazil, and especially in the state of Rio de Janeiro, the Brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) represents the most important species marketed. Although it is widely consumed in the country, the Brazilian sardine has a short shelf-life in refrigerated fresh form, with undesirable progressive changes even in that period. Despite its commercial and social importance, no innovative process aiming an increased shelf life has been developed in recent decades. Therefore, the objective of this thesis was to evaluate the effects of the High Hydrostatic Pressure (HHP) on sardine quality. Although the use of this technology in fish is already done on an industrial scale worldwide, desirable or adverse effects may occur at fish-specific intensities, and there is no relevant scientific information on sardines. Chapter I introduces sardine and HHP. Chapter II further discusses on the effects of HHP on fish in general, bringing the main results of scientific research on the central issue to discussion. In Chapter III experimental results of the application of 100, 200, 300 or 400 MPa for 0 or 15 min in sardine are presented. The increase in HHP intensity caused progressive bleaching and a slight increase in pH. The shear force and drip loss exhibited variable effects according to HHP level. It was concluded that the treatments 300 MPa / 0 min, 400 MPa / 0 min, 200 MPa / 15 min and 300 MPa / 15 min exhibited effects of greater similarity with the control (fresh, non-pressurized sardines). Chapter IV evaluated the effects of the HHP levels on the physical and chemical quality of sardines during storage (21 days, 5 ° C). It has been shown that HHP exhibits potential to: 1) attenuate shear force reduction and increase in pH occurring during storage; 2) reverse, even partially, the increase of L^* and reduction of a^* caused by the HHP itself on day 0; 3) stabilize drip loss at 300 Pa / 15 min; and 5) cause no catalysis of protein or lipid oxidations, especially up to 14 days of storage. It was concluded that there are no limitations for the processing of sardines, at the levels evaluated, regarding the main effects on physical and chemical quality. Chapter V evaluated the effects of HHP on formation of nitrogenous compounds (TMA and N-TVB) and degradation of nucleotides, traditional indicators of fish degradation. It was observed that HHP inhibited the formation of TMA and N-TVB, modified the degradation profile of nucleotides, promoted accumulation of IMP and inhibited the formation of HxR and Hx, consequently delaying the increase of K value (mainly 300 MPa / 15 min). These results suggest that APH exhibits potential for quality stabilization over the storage period.

Keywords: isostatic, fish, autolytic, storage, nucleotides

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 – Description of the process of HP in fish meat, seafood, and some land animals	11
Table 2 – Effect of the HP process on fish and seafood meat color	25
Table 3 – Results of research with HP on the texture of seafood	29
Table 4 – HP researches on sensory properties of fish and seafood	39

CAPÍTULO II

Tabela 1 – pH de filés de sardinha brasileira pressurizada (pH_{APH}) e variação do pH com a pressurização (ΔpH) por 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 min ou 15 min	49
Tabela 2 – Variação dos índices de cor de filé de sardinha brasileira pressurizada a 100, 200, 300 ou 400 MPa por 0 ou 15 min	53
Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Pearson para perda de líquido (PL), força de cisalhamento (FC), ΔpH e índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h^* e WI^*) em filé sardinha brasileira controle e pressurizada por 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min	60

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Conteúdo de água e parâmetros relacionados (perda de peso, capacidade de retenção de água, umidade e atividade de água) de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH, durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C)	68
Tabela 2 – Valor de pH de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C)	71
Tabela 3 – Oxidação lipídica (TBARs) e proteica (Teor de Carbonila) de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C)	79

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Composição e fluxo de injeção da fase móvel para quantificação de nucleotídeos em filé de sardinha brasileira	86
Tabela 2 – Contaminação inicial (dia 0) de filé de sardinha brasileira controle e tratadas por APH	87

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 – Posição sistemática da sardinha brasileira 01

CAPÍTULO I

Figure 1 – Interaction between the main mechanisms proposed for the effects of HP on the quality of pressurized fish meat 15

CAPÍTULO II

Figura 1 – Fluxo das amostras entre as análises 47

Figura 2 – Meia carcaça dos filés de sardinha com localização das análises de pH (\diamond), textura por método de cisalhamento (WB) e locais de leituras de cor (1 – 6) 47

Figura 3 – Aspecto visual dos filés de sardinhas controle e pressurizadas a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 min ou 15 min 51

Figura 4 – Índices absolutos de cor^l de carne de filé de sardinha controle (---) e pressurizada a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 (\blacktriangle) ou 15 min (\blacksquare) 52

Figura 5 – Força de cisalhamento (g) de filé de sardinha controle ou pressurizadas por 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min 55

Figura 6 – Perda de Líquido (%) da carne de filé de sardinha não pressurizada (controle) ou pressurizada a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min 57

Figura 7 – Análise de Componentes Principais (PC1+PC2 (a) e PC1+PC3 (b)), e representação de Clusters (PC1+PC2 (c) e PC1+PC3 (d)) de acordo com índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h^* , WI^*), perda de líquido, ΔpH e força de cisalhamento em filé de sardinhas controle e pressurizadas a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min 59

Figura 8 – Dendograma dos tratamentos da APH (100, 200, 300 or 400 MPa / 0 or 15 min) e controle quando observado os efeitos sobre as variáveis índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h^* e WI^*), perda de líquido, ΔpH e força de cisalhamento em filés de sardinha brasileira 61

CAPÍTULO III

- Figura 1 – Meia carcaça do filé de sardinha com posições do corte da lâmina Warner Bratzler para determinação da Força de Cisalhamento (WB-1 a 3) e posições das leituras de cor (1 a 5) 66
- Figura 2 – Força de Cisalhamento (FC) de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C) 72
- Figura 3 – aspecto visual dos filés de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C) 75
- Figura 4 – Índices de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) de carne de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C) 76

CAPÍTULO IV

- Figura 1 – Trimetilamina (TMA) e nitrogênio básico volátil total (N-BVT) de carne de filé de sardinha controle (não pressurizada) ou tratada por APH durante refrigeração a 5 ± 2 °C 89
- Figura 2 – Concentração ($\mu\text{mol.g}^{-1}$) de ATP, ADP, AMP, IMP, HxR e Hx em filé de sardinha controle ou pressurizado durante armazenamento por 21 dias a 5 ± 2 °C 92
- Figura 3 – Valor K de carne de sardinha controle ou pressurizada durante armazenamento por 21 dias a 5 ± 2 °C 94

LISTA DE ABERVIAÇÕES E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AP	Alta Pressão
APH	Alta Pressão Hidrostática
ATP	Adenosina trifosfato
CRA	Capacidade de Retenção de Água
FC	Força de Cisalhamento (g)
HP	High Pressure (Alta Pressão)
HPP	High Pressure Processing
Hx	Hipoxantina
HxR	Inosina
IMP	Inosina monofosfato
MPa	Mega Pascal
MPa.s ⁻¹	Taxa de pressurização em Mega Pascal por segundo.
N3	Ácidos graxos com primeira instauração no 3º carbono, enumerado à partir do grupo metil terminal
N3/N6	Razão entre as concentrações dos ácidos graxos N3 e N6
N6	Ácidos graxos com primeira instauração no 6º carbono, enumerado à partir do grupo metil terminal
WHC	Water Holding Capacity (Capacidade de Retenção de Água)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
Objetivos	6
Organização geral da tese	6
CAPÍTULO I – EFFECT OF HIGH PRESSURE ON FISH MEAT QUALITY – A REVIEW	7
Abstract	8
1. Introduction	9
2. Overview of hp technology	9
3. Effect of hp on fish meat	11
3.1. Effects of HP on Proteins	16
3.2. Effects of HP on Protein Oxidation	18
3.3. Effects of HP on Lipid Oxidation	20
3.4. Effects of HP on Color Parameters	23
3.5. Effects of HP on Parameters of Texture	27
3.6. Effects of HP on pH	35
3.7. Effects of HP on Water Content	37
3.8. Sensory Attributes	38
4. Conclusion	42
References	43
CAPÍTULO II – EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE QUALIDADE FÍSICA E QUÍMICA DE FILÉ DE SARDINHA BRASILEIRA (SARDINELLA BRASILIENSIS)	44
Resumo	44
Abstract	44
1. Introdução	45
2. Materiais e Métodos	46
2.1. Seleção e Preparo das Amostras	46
2.2. Pressurização	46
2.3. Análises	46
2.3.1. pH	47
2.3.2. Análise de cor	48
2.3.3. Análise de textura	48
2.3.4. Perda de peso	48
2.4. Estatística	48
3. Resultados e Discussões	49
3.1. pH	49
3.2. Índices de Cor	50
3.3. Força de Cisalhamento	54
3.4. Perda de Líquido	56
3.5. Análise de Componentes Principais e Clusters	58
4. Conclusão	61
5. Referências	61

CAPÍTULO III – ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE FILÉ DE SARDINHA BRASILEIRA (<i>SARDINELLA BRASILIENSIS</i>) TRATADA POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO	62
Resumo	62
Abstract	62
1. Introdução	63
2. Materiais e Métodos	64
2.1. Coleta e preparo das amostras	64
2.2. Pressurização	65
2.3. Análises	65
2.3.1. Conteúdo de água	65
2.3.2. Força de cisalhamento (FC)	66
2.3.3. pH	66
2.3.4. Cor	66
2.3.5. Taxa de oxidação lipídica (TBARs)	66
2.3.6. Taxa de oxidação de proteínas (Carbonilas)	67
2.4. Análise Estatística	67
3. Resultados e Discussões	67
3.1. Conteúdo de água e parâmetros relacionados	67
3.2. pH	70
3.3. Força de Cisalhamento (FC)	72
3.4. Índices de Cor	74
3.5. Taxa de Oxidação Lipídica	78
3.6. Taxa de Oxidação de Proteínas	80
4. Conclusão	81
5. Referências	81
CAPÍTULO IV – FORMAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS E DEGRADAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS EM FILÉ SARDINHA BRASILEIRA (<i>SARDINELLA BRASILIENSIS</i>) TRATADA POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA, DURANTE ARMAZENAMENTO SOB REFRIGERAÇÃO	82
Resumo	82
Abstract	82
1. Introdução	83
2. Materiais e Métodos	84
2.1. Coleta e preparo das amostras	84
2.2. Pressurização	84
2.3. Análises	84
2.3.1. Contaminação inicial	85
2.3.2. Trimetilamina (TMA) e nitrogênio básico volátil total (N-BVT)	85
2.3.3. Degradação de nucleotídeos e valor K	85
2.4. Estatística	86
3. Resultados e Discussões	86
3.1. Caracterização da contaminação Inicial	86
3.2. Trimetilamina (TMA) e Nitrogênio Básico Volátil Total (N-BVT)	88
3.3. Degradação de Nucleotídeos e Valor K	91
4. Conclusão	95
5. Referências	95

CONCLUSÃO GERAL	96
PERSPECTIVAS PARA FUTURAS PESQUISAS	97
REFERENCIAS	99
APENDICE 1 - Desenvolvimento da técnica de cromatografia para avaliação da degradação de nucleotídeos	117
APÊNDICE 2 - Identificação e curvas de calibração para quantificação dos nucleotídeos	120

INTRODUÇÃO GERAL

A *Sardinella brasiliensis*, também conhecida como sardinha brasileira ou sardinha verdadeira, é uma espécie do gênero *Sardinellas* (Figura 1), e exibe nome de espécie *Sardinella janeiro* (em desuso) como sinônimo em algumas publicações. É um peixe de pequeno porte (até 27 cm de comprimento com 3 anos de idade) que possui o corpo lateralmente comprido e prateado, e que pode ser encontrado nas costas sul e sudeste brasileira entre 30 e 100 m de profundidade e geograficamente isolada de outras espécies do gênero. Os gêneros *Sardinella* (ocorrência nos mares tropicais e subtropicais – 21 espécies), *Sardina* (ocorrência na Europa – única espécie *Sardina pilchardus*) e *Sardinops* (ocorrência no oceano pacífico – 5 espécies) são genericamente reconhecidos como “sardinhas” (WHITEHEAD, 1985; CERGOLE e DIAS-NETO, 2011).

Classe	Teleostomi
Subclasse	Actinopterygii
Infraclasse	Neopterygii
Divisão	Teleostei
Coorte	Clupeocephala
Superordem	Clupeomorpha
Ordem	Clupeiformes
Subordem	Clupeoidei
Família	Clupeidae
Subfamília	Clupeinae
Gênero	<i>Sardinella</i>
Espécie	<i>Sardinella brasiliensis</i>

Figura 1 – Posição sistemática da sardinha brasileira (CERGOLE e DIAS-NETO, 2011)

Trata-se de um peixe amplamente consumido e produzido no Brasil. Sua captura comercial ocorre desde a década de 1960 (38 mil ton em 1964) tendo ápice em 1973, com 228 mil ton. Apesar da média histórica oscilar entre 90 e 140 mil ton / ano, em 1990 houve declínio da captura para 32 mil ton e, apesar da progressiva recuperação até 1997 (117 mil ton), tornou a declinar para média de 25 mil ton entre os anos de 1999 e 2003 (CERGOLE, SACCARDO e ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 2002; SANTOS, 2014)

A redução na captura de sardinha no Brasil pode ser devido à pesca exploratória em intensidade superior à sustentável e a questões ambientais adversas no período de reprodução (BALOI et al., 2014). Entre os anos de 1980-84 e 1985-89, ocorreu redução na população de sardinhas disponíveis para pesca (CERGOLE, SACCARDO e ROSSI-WONGTSCHOWSKI, 2002). No ano de 2009, com objetivo de instituir política para preservação da sardinha e de outras espécies, foi regulamentada lei federal que dispõe sobre a paralisação temporária periódica de pesca por espécie ou para todo um ambiente, que foi denominado “período de defeso” (BRASIL, 2009). De acordo com o último Boletim de Pesca e Aquicultura publicado

em 2011, do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura, a captura de sardinha brasileira nesse ano registrou 75 mil ton representando 15,5 % de todo peixe produzido no país (BRASIL, 2011). Em 2012 e 2013, a captura evoluiu para os maiores valores registrados desde 1997, alcançando 95 e 98 mil ton, respectivamente (SANTOS, 2014).

O estado do Rio de Janeiro se destaca por ser um grande produtor nacional de sardinha brasileira, ao mesmo tempo em que esse pescado é o principal peixe capturado no estado. A atividade pesqueira no estado se iniciou no início do século XX como atividade artesanal, passando à escala comercial nos anos 60 através da instalação de fabricas de sardinha em lata na costa da Ilha Grande. A captura nas décadas de 1990 e 2000 se manteve, em média, abaixo de 10 mil ton / ano, passando a expressivo aumento entre 2009 e 2013, quando alcançou média de mais de 28 mil ton / ano. Em 2015, foi capturado em todo o estado 60,6 mil ton de peixe, dos quais 47,2 mil ton (77,79 %) foram de sardinha verdadeira. O principal município produtor foi Angra dos Reis, com 41,5 ton de sardinha, o que representou 93 % de todo o peixe capturado no estado nesse ano. Atualmente, a atividade pesqueira é realizada por cerca de 4500 pescadores artesanais e 1241 pescadores profissionais, perfil que evidencia a importância social e comercial da atividade para comunidades locais (FIPERJ, 2015; ANGRA DOS REIS, 2016)

Apesar de ser um peixe capturado predominantemente nas costas sul e sudeste do Brasil, trata-se de um pescado consumido em todo o país e por todas as classes sociais. Tradicionalmente conhecido por ser um peixe “popular”, seu consumo na forma de conservas aumentou entre as classes sociais mais ricas em 2015, alcançando 36 % das vendas entre classes A/B, contra 15 % na classe E (PINTO, 2016). Isso pode ser devido à crise econômica que viveu o país no período, uma vez que trata-se de um alimento de baixo custo dotado de características sensoriais agradáveis e de ampla diversidade de sabores, quando produzido na forma de conservas. A praticidade na forma de preparo e consumo das conservas e a crescente disseminação de informações sobre o valor nutricional de pescados também podem ter contribuído para ampla disseminação do produto no país.

Em relação ao valor nutricional, a sardinha destaca-se principalmente por ser um alimento rico em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da família ômega três (ácidos graxos com primeira instauração no 3º carbono, enumerado a partir do grupo metil terminal – N3), como o eicosapentanoico (C20:5n3; EPA) e docosahexanoico (C22:6n3; DHA), que são reconhecidamente benéficos à saúde do consumidor. A ingestão desses ácidos graxos vem sendo relacionada com a redução de doenças cardiovasculares, controle de colesterol, redução do risco de desenvolvimento de doenças como Alzheimer, diabetes tipo 2 e câncer, prevenção e combate à epilepsia e no desenvolvimento cerebral de bebês (SILVA, MIRANDA JÚNIOR e SOARES, 2007; SCORZA, ALMEIDA e SCORZA, 2014). No entanto, para alcançar esses efeitos, pode ser necessário a ingestão entre 200 e 650 mg / dia de EPA + DHA, média que pode ser considerada elevada para alguns países europeus e para os EUA (dieta usual contém 90 mg / dia na Holanda até 380 mg / dia na França, e 100 - 200 mg / dia no EUA), e muito reduzida para o japonês (consome em média 2000 mg / dia) (LOPEZ-HUERTAS, 2010). O consumo de um filé de sardinha brasileira grelhada de aproximadamente 50 g fornece até 1000 mg de EPA + DHA (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008).

Apesar de haver indícios de que o consumo excessivo desses ácidos graxos pode causar efeitos adversos sobre o tempo de coagulação do sangue, controle de índice glicêmico e de colesterol (BRASIL, 2014), a *European Food Safety Authority* considera que o consumo de até 5000 mg / dia pode não ser prejudicial a adultos (EFSA, 2012).

A composição química da carne de sardinha *in natura* pode ser influenciada por diversos fatores, como estação do ano, idade e alimentação (LUZIA et al., 2003; BALOI, et al., 2017). Já o tipo de processamento industrial e a forma de preparo doméstico podem promover alterações químicas (GARCÍA-ARIAS et al., 2003a; GARCÍA-ARIAS et al., 2003b; SALDANHA; BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; TARLEY et al., 2004) e determinar a extensão da sua vida útil.

A sardinha enlatada constitui uma das principais formas de conservação e comercialização do pescado, contribuindo para sua disseminação e aumento do consumo em todo o mundo, especialmente naquelas regiões que demandam alimentos de mais rápido preparo (FIRETTI, ASTOLPHI e GARCIA, 2013). Nesse formato, a sardinha figura como a segunda principal espécie industrializada no mundo, ficando atrás apenas do atum (FERRARO et al., 2013). No processamento das conservas, as sardinhas, após evisceração, escamação e remoção da cabeça, são acondicionadas nas latas, adicionado de líquido de cobertura, promovido fechamento hermético das latas (recravação) e acondicionadas em autoclaves programadas para operar usualmente entre 115 – 130 °C / 30 e 60 minutos.

Apesar de esse processo proporcionar maior praticidade (cozimento e amaciamento da espinha torna o produto pronto para o consumo), diversificação de sabores (diferentes líquidos de coberturas como óleo de soja, molho de tomate, salmoura, entre outros) e extensão da vida útil resultando entre dois e quatro anos, a exposição à alta temperatura pode promover diversas alterações indesejáveis como a formação de óxidos de colesterol, migração de constituintes entre o pescado e o líquido de cobertura, o que pode levar à redução na concentração de EPA e DHA (evento crítico se considerado hábito de não consumo do líquido de cobertura) e aumento dos ácidos graxos N6 (ácidos graxos com primeira instauração no 6º carbono, enumerado à partir do grupo metil terminal) na carne da sardinha, e aumento da relação entre ácidos graxos saturado:insaturado na carne da sardinha (ZUNIN, BOGGIA e EVANGELISTI, 2001; TARLEY et al., 2004).

A comercialização nas formas de pescado fresco, pescado filetado refrigerado e pescado filetado congelado são as preferidas pelos consumidores (FIRETTI, ASTOLPHI e GARCIA, 2013), provavelmente pela associação com “o natural”, “saudável”, “não processado”, “não industrializado”, “livre de conservantes”, entre outros. No entanto, por se tratar de matéria-prima altamente perecível (pH neutro, elevada atividade de água, intensa atividade microbiana e de enzima autolíticas), exige manutenção de frio em toda cadeia e, mesmo assim, apresenta vida útil de apenas dez dias a 0 °C (ANDRADE et al., 2012). Ainda assim, diversas pesquisas com *Sardinella* spp. demonstram que, mesmo dentro do período de vida útil, ocorre aumento dos índices de peróxido e de TBA, formação de ácidos graxos livres, oxidação de colesterol, formação de compostos nitrogenados como N-BVT (nitrogênio básico volátil total), TMA (trimetilamina), aminas biogênicas, crescimento microbiano, descoloração, perda de dureza, alteração no pH, perda de capacidade de retenção de água e aumento do *drip loss* em carne de sardinha refrigerada ou congelada (ÖZOGUL, POLAT e ÖZOGUL, 2004; PEREIRA e TENUTA-FILHO, 2005; CHAIJAN et al., 2006; ÖZOGUL e ÖZOGUL, 2006; SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; ANDRADE et al., 2012; MOHAN et al., 2012)

Pesquisa realizada com sardinha indiana (*Sardinella longiceps*) observou que, durante o armazenamento a 1-2 °C por até 11 dias, há progressiva redução nos escores sensoriais (aparência, cor, odor e avaliação global), aumento da contagem microbiana (contagem total), aumento de pH, de TBA, de ácidos graxos livres e concentração de BVT e TMA, aumento do *drip loss* e redução de capacidade de retenção de água, redução na dureza e descoloração

(MOHAN et al., 2012). Já sardinha mediterrânea (*Sardina pilchardus*) armazenada a 4 °C por até 15 dias exibiu aumento progressivo na concentração de amins biogênicas e redução na avaliação global de frescor (ÖZOGUL e ÖZOGUL, 2006). O congelamento e descongelamento (em condição de refrigeração ou por microondas) de sardinha (*Clupea pilchardus*) causou alteração na composição centesimal e no perfil de aminoácidos, e oxidação de proteínas expressa pela redução de grupos –SH (GARCÍA-ARIAS et al., 2003a).

Adicionalmente, o preparo doméstico das sardinhas também promove alterações no perfil de ácido graxo e formação de óxidos de colesterol. Sardinha frita em óleo de soja absorve esse óleo e, por isso, exhibe aumento no teor de ácido oleico (C18:1n9) e redução de EPA e DHA, o que contribui para redução da razão entre as concentrações dos ácidos graxos N3/N6 (GARCÍA-ARIAS et al., 2003a).

O preparo na forma grelhada pode promover perda de até 32 % do ácido graxo EPA e 23 % do DHA, e promover aumento na concentração de derivados da oxidação do colesterol de 19,4 para 41,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008). Uma pesquisa realizada em restaurantes do estado de Santa Catarina, importante estado produtor e consumidor de sardinha, demonstrou que a principal forma de preparo do peixe é frito (frequência de 78,9 %), seguido de cozido e posteriormente do grelhado (SILVA, ROCHA e AMARAL, 2015).

Portanto, os processos de conservação e preparo doméstico podem promover alterações indesejáveis na sardinha que se somam até o ato do consumo. Uma vez que o preparo doméstico é uma etapa indispensável, uma forma de minimizar as perdas relacionadas é o uso de técnicas de processamento mais eficientes. Nesse cenário, a Alta Pressão Hidrostática (APH) vem sendo apontada como bastante promissora. Apesar de haver diversas pesquisas que sugerem a viabilidade técnica em processar diversas espécies de pescados por APH, pouca ou nenhuma informação há sobre o efeito dessa tecnologia sobre indicadores de qualidade de sardinhas.

Apesar de muitas vezes ser referida como uma tecnologia emergente, os primeiros estudos sobre a tecnologia datam da década de 1880 (aplicação em conservação de leite) e a aplicação industrial já ocorre desde a década de 1990 nos EUA e Japão (RASTOGI, 2013). Atualmente, existe mais de 300 unidades industriais em todo o mundo processando todo tipo de alimento, e, entre eles, o pescado representa 5 % de todo alimento pressurizado no mundo (HUANG, et al., 2017).

O processo consiste em acondicionar o alimento previamente envasado em embalagens flexíveis (usualmente seladas a vácuo ou em atmosfera modificada) em uma câmara (vaso de pressão de alta resistência à pressão) que é inundada por um fluido de pressurização, usualmente solução alcoólica ou água pura, até seu total preenchimento, removendo completamente o ar do seu interior. Em seguida, o sistema é hermeticamente fechado através de selos de alta resistência, permitindo apenas entrada de volume adicional do fluido de pressurização através de pistões e/ou bombas. A força com que pistão e/ou bomba atua empurrando o fluido para dentro da câmara determinará a pressão transferida para o sistema.

Sua aplicação se baseia na capacidade da pressão modificar macromoléculas orgânicas (proteínas, lipídios e carboidratos) e, conseqüentemente, alterar atividade enzimática (ativar ou inativar de acordo com intensidade e tipo de enzima) e estruturas celulares que podem levar à morte microbiana sem, no entanto, afetar moléculas menores como vitaminas e

compostos de *flavour*, contribuindo para preservação do aspecto de frescor do alimento processado. Dessa maneira, apresenta como maior vantagem o fato de promover conservação do produto, exibindo potencial para manutenção da aparência, sabor e textura o mais próximo do produto fresco não processado. Apesar de haver discreto aumento da temperatura do alimento em função da transferência de calor adiabático (em água seria aumento de cerca de 3 °C a cada 100 MPa), é considerada uma tecnologia fria (não térmica) (CAMPUS, 2010; TRUONG et al., 2015; HUANG et al., 2017).

De acordo com os fenômenos termodinâmicos que descrevem o processo, a pressão é transmitida ao alimento de forma instantânea e uniforme em toda a amostra, independente do formato, reologia ou tamanho. Não há gradiente de pressão em relação ao equipamento ou internamente à amostra, o que representa uma importante vantagem por prevenir ocorrência de subprocessamento. Apresenta *come up time* (tempo de aumento de pressão até nível de *set point*) bastante inferior ao observado em processos térmicos, e a despressurização é praticamente instantânea. É um processo energeticamente favorável uma vez que não exige aporte de energia adicional para sustentar a pressão alcançada (BALASUBRAMANIAM, FARKAS e TUREK, 2008)

Em pescados, sua aplicação é avaliada desde a década de 1980 em atum, camarão, ostra, salmão, bacalhau, truta, entre outros. Os benefícios observados se mostram dependentes da intensidade dos parâmetros de pressurização aplicados (tempo e pressão) e, principalmente, da espécie analisada. As pesquisas sugerem que a tecnologia é eficiente na conservação, sendo capaz de inativar enzimas autolíticas e reduzir microbiota deteriorante e patogênica, bem como inibir processos relacionados à atividade microbiana, como a produção de aminas biogênicas e de compostos nitrogenados. No entanto, a partir de determinada intensidade de tratamento (variável de acordo com a espécie), alterações físicas e químicas podem ocorrer e causar alterações em importantes aspectos de qualidade, como a cor, textura, oxidação lipídica, variação de pH e perda de líquido exsudado. O Capítulo 1 dessa tese (OLIVEIRA et al., 2017) apresenta o resultado de profunda revisão de literatura que trata de algumas das principais alterações que podem ocorrer em pescados submetidos ao processo de alta pressão.

Não há informação sobre a aplicação da APH no processamento industrial de sardinha em todo o mundo. Da mesma forma, não foi encontrado em toda literatura consultada pesquisa que avaliasse a aplicação de APH no processamento de sardinha brasileira. Existem escassas pesquisas sobre aplicação de APH em *Sardinellas* spp. que não permite concluir sobre a viabilidade desse processamento. Considerando similaridades bioquímicas e fisiológicas entre a sardinha e outros pescados mais amplamente avaliados quanto aos efeitos do processamento por APH, as chances desse processo ser tecnicamente viável são grandes, ainda que seja necessário investigar mais especificamente os melhores parâmetros do processo (tempo, pressão e temperatura de pressurização).

Adicionalmente, avanços em pesquisas sobre processamento de sardinha por APH e a eventual observação de resultados que confirmem viabilidade técnica e econômica do processo pode contribuir para o surgimento de uma nova forma de apresentação do produto “sardinha”, o que pode levar a um significativo incremento em seu valor agregado.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da Alta Pressão Hidrostática (APH) na qualidade de filés de sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*).

Objetivos Específicos

- Aprofundar o conhecimento acerca dos efeitos da APH na qualidade física e química de pescados;
- Avaliar o efeito da APH sobre os principais atributos instrumentais de qualidade (cor, textura, perda de peso, pH e conteúdo de água) dos filés de sardinha pressurizados durante período de armazenamento de 21 dias em refrigeração (5 °C);
- Avaliar o efeito do processamento da APH na formação de produtos de origem microbiana e autolítica, expressos através da degradação de nucleotídeos, e formação de compostos nitrogenados dos filés de sardinha brasileira durante período de armazenamento de 21 dias em refrigeração (5 °C);

ORGANIZAÇÃO DA TESE

A presente tese é composta de uma introdução, um capítulo de revisão de literatura, três capítulos de resultados analíticos produzidos, e capítulo posterior com considerações gerais sobre a pesquisa. Todas as referências citadas em todos os capítulos são apresentadas em sessão única ao final da tese. A seguir são apresentados títulos de cada um dos capítulos:

- Introdução geral
- Capítulo I: Effect of high pressure on fish meat quality – A review
OLIVEIRA, F.A, NETO, O.C., SANTOS, L.M.R., FERREIRA, E.H.R., ROSENTHAL, A., Effect of high pressure on fish meat quality – A review, *Trends in Food Science & Technology*, v.66, p. 1-19, 2017. doi: 10.1016/j.tifs.2017.04.014.
- Capítulo II: Efeito da Alta Pressão Hidrostática sobre qualidade física e química de filé de sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*).
- Capítulo III: Estabilidade física e química de filé de sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) tratada por alta pressão hidrostática e armazenada sob refrigeração.
- Capítulo IV: Formação de compostos nitrogenados e degradação de nucleotídeos em filé sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) tratada por alta pressão hidrostática, durante armazenamento sob refrigeração
- Conclusão Final
- Perspectivas para futuras pesquisas
- Referências

CAPÍTULO I



Trends in Food Science & Technology

Volume 66, August 2017, Pages 1-19



EFFECT OF HIGH PRESSURE ON FISH MEAT QUALITY – A REVIEW

Fabiano Alves de Oliveira^{a*}, Otávio Cabral Neto^b, Lígia Marcondes Rodrigues dos Santos^c,
Elisa Helena Rocha Ferreira^d, Amauri Rosenthal^e

^aFood Technology Department Federal Rural University of Rio de Janeiro, UFRRJ and Federal Center for Technological Education, Cefet / RJ, Rio de Janeiro, 23.890-000, Brazil

^bFederal Institute of Education, Science and Technology of Tocantins, Dianópolis, Tocantins 77.300-000, Brazil

^cFederal Center for Technological Education, Cefet / RJ, Valença, Rio de Janeiro 27.760-000, Brazil

^dFood Technology Department Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 23.890-000, Brazil

^eEmbrapa Food Technology, Rio de Janeiro 23.020-470, Brazil

* Corresponding author: fabiano.oliveira@cefet-rj.br (F. Alves de Oliveira)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.014>
0924-2244/© 2017 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article as: OLIVEIRA, F.A, NETO, O.C., SANTOS, L.M.R., FERREIRA, E.H.R., ROSENTHAL, A., Effect of high pressure on fish meat quality – A review, *Trends in Food Science & Technology*, v.66, p. 1-19, 2017. doi: 10.1016/j.tifs.2017.04.014.

EFFECT OF HIGH PRESSURE ON FISH MEAT QUALITY – A REVIEW

Abstract

Background: High pressure (HP) is an effective technology in food preservation. However, in fish, changes in appearance, texture, and chemical composition of the meat can be observed in more severe conditions. Although there are proposed mechanisms to achieve these events, there is no consistency of information to conclude on all of them.

Scope and approach: After a brief overview of HP technology, their main impact of fish meat quality were reviewed considering the targeted constituents and underlying mechanisms.

Key findings and conclusions: The main changes occurred between 200 and 300 MPa leading to a partial or total denaturation of proteins. In turn, these modifications were related to the increase of pH, hardness, whitening, decrease in water holding capacity, initiation of lipids, and proteins oxidation. The proposed mechanisms for these effects are very similar, suggesting the interrelationship between them. Lipid oxidation, protein oxidation, and discoloration are enhanced by iron content of the tissues (heme or free) and, possibly, with synergic phenomena. However, there is no consistency of information on the effects of these changes on consumers' opinion. Additionally, the intensity of the changes varies according to type of fish. Research is needed to determine clearly the reaction mechanisms, evaluate the effects of these changes concerning consumers' opinion, and propose devices or strategies to minimize these changes when necessary.

Highlights:

- The effects of HP processing on fish meat quality are derived primarily from the effect on proteins;
- Lipids and proteins oxidation and meat discoloration are interrelated;
- Increase in moisture is related to reduced water holding capacity rather than increased protein hydration;
- There is consistency in increased hardness, despite the variability of methodologies;
- Scarce research suggested no adverse modification on sensory properties

Keywords: High hydrostatic pressure technology
Protein unfolding
Water holding capacity
Lipid oxidation
Protein oxidation
Meat discoloration
Hardness increase.

1 INTRODUCTION

Consumers increasingly seek food that is safe for consumption, with a long shelf life, easy to prepare and consume, additive-free, and with preserved freshness, sensory, and nutritional properties. However, the production of this type of food requires changes in formulations and processes, which may increase the risks associated with its consumption. In this scenario, physical processes, such as dense phase carbon dioxide, pulsed electric field, ozone processing, ultrasound processing, high hydrostatic pressure processing, radiation processing, high-voltage arc discharge, pulsed visible light, and magnetic fields have gained prominence, since they can extend the shelf life of the product, and promote safety without significant changes in the sensory attributes and nutritional quality (MA et al., 2007; RAWSON et al., 2011).

High pressure (HP) is a non-thermal technology capable of inactivating vegetative cells of pathogenic and spoilage microorganisms, modifying enzymatic activity, reducing losses of desirable compounds, thus preserving freshness and nutritional values of foods (HUANG et al., 2014). Its application in fish and fish products is based on the ability to render inactivate parasites and microorganisms, to increase shelf life, and provide increased performance of the deboning process of bivalves and crustaceans, promoting easier and complete removal of meat.

Fish has high nutritional value, especially high biological value proteins and lipids, being marketed and consumed worldwide. Fatty fish has high concentration of n-3 fatty acids, which is often perceived by consumers as beneficial for human health (RUXTON et al., 2005). However, fish is highly perishable due to their pH which is close to neutral, presents high water activity, is rich not only in unsaturated fatty acids but also in free amino acids, and exhibits active autolytic enzymes, making it prone to microbial and oxidative degradation (LOUGOVOIS; KYRANA, 2005). Moreover, it is often eaten raw or undercooked, serving as vehicles for many health hazards. Among the conventional preservation methods, heat treatment can lead to changes in appearance, texture, and flavor, besides affecting nutritional value. In turn, refrigeration can slow its deterioration rate, but limits shelf life to 7-14 days (CHAIJAN et al., 2006; PEREIRA; TENUTA-FILHO, 2005), while freezing extends shelf life, but can lead to undesirable changes in nutritional value, such as cholesterol oxidation (SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008), besides incurring high energy costs in processing and storage.

HP assessment in fish has been intensively carried out since the 1990s, with very positive results. As for other preservation processes, the benefits strongly depend on the intensity and time of the HP treatment. There is consensus that applied pressure between 500 and 600 MPa can be effective for stabilization of meat, providing pasteurization conditions (CAMPUS, 2010; GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016). However, effects such as discoloration, increased hardness, changes in water holding capacity, pH variations, lipid oxidation, protein oxidation among others, can occur in more intensive treatments. Thus, it is essential to understand the mechanisms of these changes, to propose alternatives to minimize their negative effects. The objective of this research is to address the effects of HP on the physicochemical characteristics of fish, and further discuss underlying mechanisms.

2 OVERVIEW OF HP TECHNOLOGY

HP studies were initially reported in 1899 for milk conservation, and rose to industrial scale in 1990 in Japan, in the processing of jams, jellies, and sauces, and later in the USA, in

guacamole (RASTOGI, 2013). In 2010, there were about 150 high pressure units worldwide, processing 250,000 tons of vegetables (33%), meat (30%), fish (15%), and juices and beverages (12%), comprising 71 industries in America, 26 in Europe, 22 in Asia, and 5 in Oceania (CAMPUS, 2010; MÚJICA-PAZ et al., 2011). Over the past seven years, industrial equipment reached more than 300 units worldwide, mainly located in North America (54 %), Europe (25 %), and Asia (12 %), moving \$ 10 billion in 2015, with a tendency to increase and to reach \$ 54.7 billion in 2025 (HUANG et al., 2014, 2017; REYES et al., 2015).

The HP system consists of a pressure chamber, a generation and intensification pressure systems, and a compression fluid (usually water or alcoholic solution). During operation, the compression fluid which increases the pressure is forced into the chamber containing the sample. The industrial food processing equipment is around 500 liters capacity, capable of operating at maximum pressures of 900-1200 MPa, although the most common is around 400-600 MPa (BAJOVIC; BOLUMAR; HEINZ, 2012; BALASUBRAMANIAM; FARKAS; TUREK, 2008). Usually, most of the pressurized samples are already packaged in flexible plastic material prior to the high pressure processing.

Although the equipment is expensive, ranging from \$ 500,000 to \$ 2.5 million, the operating costs are in the same order of magnitude than other thermal processes (BALASUBRAMANIAM et al., 2008; Campus et al., 2010), ranging from \$0.05 to 0.5/L (or Kg) (MÚJICA-PAZ et al., 2011; RASTOGI, 2013). However, it is possible that consumers will be willing to pay \$ 0.25-0.50 more for pressurized products ready for consumption (HICKS et al., 2009).

The worldwide spread of technology involves the development of different applications. Initially, the pressurization was conducted with the main objective to promote conservation and food safety (by inactivating microorganisms or modifying enzymatic activity). HP is also able to promote changes in the rheological properties of biopolymers, acting as assistant thawing, enabling reduction in salt content and allergenic potential of foods, and as a preprocess for the extraction of bioactive compounds (BALASUBRAMANIAM; FARKAS; TUREK, 2008b; BARBA et al., 2015).

The various applications of HP are due to the fact that it is a selective technology with main direct effects on macromolecules such as proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates, and water molecules, while the compounds with low molecular weight commonly associated with the sensory and nutritional quality (vitamins, minerals, aromatics, flavors, etc.) are not affected by HP treatment (HUANG, et al., 2014). This is because the chemical interactions that stabilize these compounds behave differently when subjected to HP, and while covalent bonds are not affected by the process, other interactions (ionic interactions, hydrophobic, hydrogen bonds, disulfide bonds) may be more easily affected.

The effects of HP on food components are the result of related thermodynamic principles. The pressure is transferred uniformly and instantaneously to the entire sample (*Isostatic Principle*) independent of its size, shape, or rheology, without gradient inside the equipment, between the equipment and the sample, and between different locations in the sample (BARBA et al., 2015; CAMPUS, 2010; TRUONG et al., 2015). Hence, in order to minimize the pressure effect (*Le Chatelier Principle*), reactions that have a final volume smaller than the initial volume ($\Delta V < 0$), such as protein compaction, fat solidification, reorganization of water molecules into smaller volume arrangement, are favored in the sample (BAJOVIC; BOLUMAR; HEINZ, 2012; CARLEZ; VECIANA-NOGUES; CHEFTEL, 1995; MÚJICA-PAZ et al., 2011). However, volume reduction is not enough to completely

compensate pressure effect and then temperature raises (*Adiabatic Heat*). Although it is considered a non-thermal technology, slight heating may occur according to pressure levels, food composition, and initial temperature (pure water at 25 °C and 90 °C can increase 3 °C / 100 MPa, and 5.3 °C / 100 MPa, respectively, and high-fat foods can present temperature increases from 6 to 8.7 °C / 100 MPa (BALASUBRAMANIAM et al., 2004)), even though after depressurization, the temperature returns to initial values close to, or slightly lower, due to heat losses during the process (BALASUBRAMANIAM; FARKAS; TUREK, 2008).

This technology is commonly unable to sterilize products, since a pressure of up to 1700 MPa may be used (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2014), which is commercially unfeasible due to the high cost and the undesirable effects on a product's quality. An alternative is the association of HP with temperature. Studies have shown an effectiveness of the association between pressure and temperature for sterilization (AHN; LEE; BALASUBRAMANIAM, 2015; NGUYEN; BALASUBRAMANIAM; RATPHITAGSANTI, 2014) and preservation of physicochemical, sensory, and nutritional quality of foods (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2014; SEVENICH et al., 2013).

3 EFFECT OF HP ON FISH MEAT

The effects of HP on fish have been reported especially for those with higher added value, such as shrimp, salmon, cod, and oysters, among others. The most common treatments use pressure levels between 100 and 600 MPa for a period of time ranging from a few seconds to 10-15 minutes. Table 1 presents some publications about the application of HP in fish, showing species and pressurization parameters (time, pressure level, and temperature). Considering the similarities of some biochemical and physiological aspects between fish, seafoods and land animals, some HP studies with mollusks, crustaceans, cattle, pigs, and poultry have been included to assist in the understanding of the mechanisms involved.

Table 1 – Description of the process of HP in fish meat, seafood, and some land animals

Product		Pressure Treatments*	Reference
<i>Fish</i>			
Bluefish	<i>Pomufomus salfafri</i>	100, 200, and 300 MPa / 30 min	ASHIE ET AL., 1997
Bonito	<i>Euthynnuspelamis</i>	100 and 200 MPa / 30 min	WADA & OGAWA, 1996
Carp	<i>Cyprinus carpio</i>	100, 140, 180, and 200 MPa / 15 and 30 min / 4 °C	SEQUEIRA-MUNOZ ET AL., 2006
	<i>Cyprinus carpio</i>	100, 200, and 300 MPa / 10 min (thawing ²)	YOSHIOKA ET AL., 1996
Cod	<i>Gadus morhua</i>	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / RT	ANGSUPANICH & LEDWARD, 1998
	<i>Gadus morhua</i>	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / RT	ANGSUPANICH ET AL., 1999
	<i>Gadus morhua</i>	200 MPa (thawing)	SCHUBRING ET AL., 2003

Continues

Table 1 – Continuation

	<i>Gadus morhua</i> L.	400, 500, and 600 MPa / 5 and 10 min	MONTIEL ET AL., 2012
Hake	<i>Merluccius capensis</i>	200 and 400 MPa / 5 min / 7 °C	HURTADO., 2000
Haddock	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	200 MPa (thawing)	SCHUBRING ET AL., 2003
Herring	<i>Clupea harengus</i>	600 MPa / 10 min	FIGUEIREDO ET AL., 2015
	<i>Clupea harengus</i>	50, 100, 150, 200, 250, and 300 MPa (thawing)	SCHUBRING, 2005
Mackerel	<i>Trachurus trachurus</i>	150, 300, and 400 MPa / 0, 2.5 and 5 min / 20 °C RT	TORRES ET AL., 2013
	<i>Scomber scombrus</i>	150, 300, and 450 min / 0, 2.5 and 5 min / 20 °C RT	AUBOURG ET AL., 2013
	<i>Scomber scombrus</i>	600 MPa / 10 min	FIGUEIREDO ET AL., 2015
Mahi Mahi	<i>Coryphaena hippurus</i>	150, 300, 450, and 600 MPa / 15 min / RT	YAGIZ ET AL., 2007
Ocean perch	<i>Sebastes marinus</i>	50, 100, 150, 200, 250, and 300 MPa (thawing)	SCHUBRING, 2005
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	200 MPa (thawing)	SCHUBRING ET AL., 2003
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	150, 300, 450, and 600 MPa / 15 min / RT	YAGIZ ET AL., 2007
Red mullet	<i>Mullus surmelutus</i>	220, 250, and 300 MPa / 5 and 10 min / 3, 7, 15 and 25 °C	ERKAN ET AL., 2010
Redfish	<i>Sebastes marinus</i>	200 MPa (thawing)	SCHUBRING ET AL., 2003
Saithe	<i>Pollachius virens</i>	50, 100, 150, 200, 250, and 300 MPa (thawing)	SCHUBRING, 2005
Salmon	<i>Salmo salar</i>	150 and 300 MPa / 15 min	YAGIZ ET AL., 2009
	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	135 , 170, and 200 MPa/ 30 seg / 15 ± 2 °C (RT)	ORTEA ET AL., 2010
	<i>Salmo salar</i>	400, 500, 600, 600, 800, and 900 MPa / 10, 20, 30, and 60 seg / RT	GUDBJORNSDOTTIR ET AL., 2010
	<i>Salmo salar</i>	200 MPa (thawing)	SCHUBRING ET AL., 2003
	<i>Salmo salar</i>	100, 150, and 200 / 10 and 20 min / RT	LAKSHMANAN ET AL., 2007
	Obtained from a local fish company	100, 150, and 200 MPa / 10, 30, and 60 min / 1 - 5 °C	AMANATIDOU, 2000
	Obtained from a local fish company	220, 250, and 300 MPa / 5 and 10 min / 3, 7, 15 and 25 °C	ERKAN ET AL., 2011
	Procured from a local processor	100, 150, 200, and 300 MPa / 20, 25, and 30 min / 10, 20, and 30 °C	LAKSHMANAN ET AL., 2005

Continues

Table 1 - Continuation

	Purchased from a local supermarket	100, 150, 200, and 300 MPa / 20 min / 9 °C	LAKSHMANAN ET AL., 2005
Sardine	<i>Sardinops melanostica</i>	100 and 200 MPa / 30 min	WADA & OGAWA, 1996
Sea bass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	250 and 400 MPa / 5 min / 6 °C	TEIXEIRA ET AL., 2014
	<i>Dicentrarchus labrax L.</i>	100, 200, 300, 400, and 500 MPa / 5 min / 10 °C	CHERET et al., 2005
Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	50, 100, 150, and 200 MPa / 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min / 0 °C	HSU & KO, 2001
	<i>Oreochromis niloticus</i>	50, 100, 150, and 200 MPa / 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min / 0 °C	KO ET AL., 2003
Tuna	<i>Thunnus alalunga</i>	275 and 310 MPa / 2, 4, and 6 min	RAMIREZ-SUAREZ & MORRISSEY, 2006
Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	100, 140, 180, and 200 MPa / 15 and 30 min / 4°C	CHEVALIER ET AL., 2001
Threadfin bream	<i>Nemipterus spp.</i>	200, 400, and 600 MPa for 10, 30, and 50 min	ZHOU ET AL., 2014
Whiting	<i>Merlangius merlangius</i>	200 MPa (thawing)	SCHUBRING ET AL., 2003
<i>Molluscs</i>			
Abalone	<i>Haliotis discus hannai</i>	100, 200, 300, 400, and 500 MPa / 3 min	JO ET AL., 2014
	<i>Haliotis rufecens</i>	500 MPa / 8 min; 550 MPa / 3 and 5 min (RT ¹ 20 °C)	BRIONES-LABARCA ET AL., 2012
Bay scallop	<i>Argopecten irradians</i>	150 MPa / 2 and 3 min; 200 MPa / 0, 2, and 3 min; 300 MPa / 0, 2, and 3 min; 350 MPa / 2, and 3 min; 400 MPa / 0 min	YI, XU, ET AL., 2013
	<i>Aequipecten irradians</i>	200 and 400 MPa / 10 min / 22 °C	PEREZ-WON ET AL., 2005
Octopus	<i>Octopus vulgaris</i>	200, 300, and 400 MPa / 15 min / 7 and 40 °C	HURTADO ET AL., 2001
Oysters	<i>Crassostrea gigas</i>	260, 400, and 600 MPa / 5 min / 20 °C	CRUZ-ROMERO ET AL., 2008
	<i>Crassostrea gigas</i>	260, 500, and 800 MPa / 3 or 5 min	CRUZ-ROMERO ET AL., 2008
	<i>Crassostrea gigas</i>	100, 300, 500, and 800 MPa / 10 min / 20°C	CRUZ-ROMERO ET AL., 2004
	<i>Crassostrea gigas</i>	260 MPa / 3 min / 20 °C	CRUZ-ROMERO ET AL., 2007

Continues

Table 1 - Continuation

<i>Crustaceans</i>			
Shrimp	Ready-to-eat wine-marinated	550 MPa / 5 min	YI, ZHANG, ET AL., 2013
	<i>Penaeus monodon Fabricius</i>	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / 28 °C	JANTAKOSON ET AL., 2012
	<i>Penaeus monodon</i>	100, 270, and 435 / 5 min / 25° C (RT)	KAUR ET AL., 2013
	<i>Fenneropenaeus indicus</i>	100, 170, 435, and 600 MPa / 5 min / 25 °C	BINDU ET AL., 2013
<i>Land animals</i>			
Chicken	Chicken breast	100, 200, 300, 400, and 500 MPa / 0 min	ZHANG ET AL., 2015
	Chicken breast	300, 500, and 900 MPa / 30 min / 20 °C	BELTRAN ET AL., 2004
	Chicken breast	300, 400, 500, 600, 700, and 800 MPa / 5 and 10 min	ORLIEN ET AL., 2000
	Chicken breast	800 MPa / 10 min / 20 °C	BOLUMAR ET AL., 2014
	Chicken breast	400 and 600 MPa / 15 min / 5 °C	SCHINDLER ET AL., 2010
Beef	<i>M. pectoralis profundus</i>	200, 300, and 400 MPa / 20 min / 20 and 40 °C	MCARDLE ET AL., 2010
	<i>Semitendinosus</i>	100, 200, 300, and 400 MPa / 5 min	LEE ET AL., 2007
	<i>Semimembranosus</i>	200, 250, 300, 350, 400, 450, and 500 MPa / 10 min / 10 °C	CARLEZ ET AL., 1995
Pork	Beef loin	800 MPa / 10 min / 20 °C	BOLUMAR ET AL., 2014
	<i>Longissimus</i>	500 MPa / 20 min / 20 °C	HUANG ET AL., 2012
	<i>Longissimus</i>	200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, and 800 MPa / 10 min / 20 °C	BAK ET AL., 2012
Turkey	Pork leg	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / RT	CHEAH & LEDWARD, 1996
	Semitendinosus	600 MPa for 6 min	GROSSI ET AL., 2014
	Deboned turkey	200 and 400 MPa / 20 min	TUBOLY ET AL., 2003
	Breast muscle	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / RT	ANGSUPANICH ET AL., 1999

* The term '0 min' refers to treatments where the samples were brought to set process pressure followed by immediate decompression

¹ RT: Room temperature

² Thawing: pressure-assisted thawing

Figure 1 summarizes the main mechanisms and effects of HP on the quality of fish meat. It is possible to observe that the effects of HP on proteins are key in understanding the other effects, and that by considering the strong similarities between the processes, it is expected that they do not occur in isolation, but sequentially or simultaneously.

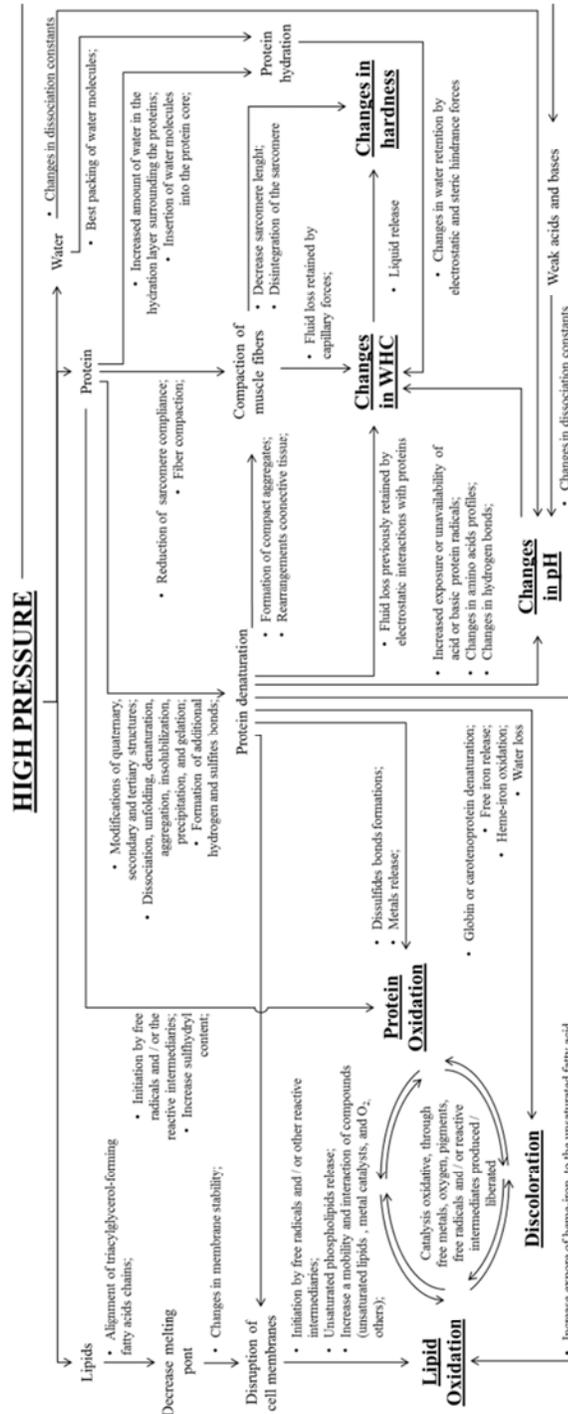


Figure 1 - Interaction between the main mechanisms proposed for the effects of HP on the quality of pressurized fish meat

3.1 Effects of HP on Proteins

Proteins are key molecules modified by HP, since they are compressible due to dimensional arrangement with internal empty spaces (TRUONG et al., 2015). Changes in protein folding can promote reduction of up to 1.0% of the protein volume (SILVA; FOGUEL; ROYER, 2001) through changes in quaternary, tertiary, and secondary structures, leading to dissociation, unfolding, denaturation, aggregation, precipitation, and gelatinization in varying intensities (LULLIEN-PELLERIN; BALNY, 2002; MESSENS; CAMP, VAN; HUYGHEBAERT, 1997). It is suggested that pressures lower than 150 MPa affect mainly quaternary structures, while the tertiary structure is affected at 200 MPa, and pressure ranging from 300 to 700 MPa is required to induce changes in the secondary structure and protein denaturation (LULLIEN-PELLERIN; BALNY, 2002).

Changes in the primary structure are not expected, since covalent bonds have reduced compressibility (CHEFTEL; CULIOLI, 1997) with dissociation energy greater than that transferred during the process (dissociation O-H 350 kJ / mol, C-C 470 kJ / mol, and peptide 330-400 kJ / mol) (MESSENS; CAMP, VAN; HUYGHEBAERT, 1997; NELSON; COX, 2012) and the energy for pressurizing 1 liter of water up to 400 MPa is similar to that required for heating the same volume at $\Delta T = 5$ °C, 19.2 kJ (RASTOGI, 2013)). Hydrogen and disulfide bonds show relative stability, and the formation of additional links is enhanced in certain pressure levels due to closeness of the components (HEDGES; GOODBAND, 2003; JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012; RAMIREZ-SUAREZ; MORRISSEY, 2006). In contrast, electrostatic and hydrophobic interactions are more sensitive to HP due to the low dissociation energy (between 1 and 84 kJ / mol), and destabilization due to volume reduction (MOZHAEV et al., 1996). Hydrophobic interactions are destabilized by alignment and proximity of water molecules to hydrophobic groups (CHEFTEL; CULIOLI, 1997).

Ground meat and fish are complex systems made up of several groups of proteins, such as myofibrillar, sarcoplasmic, and stroma. Myosin tails are more stable than the myosin heads, because the former is stabilized by hydrogen bonds, while the second by hydrophobic interactions (HEDGES; GOODBAND, 2003). Myosins of various fish denature between 100 and 200 MPa, actin from 200 MPa, while sarcoplasmic proteins are more resistant and may be stable up to 400 MPa (HEDGES; GOODBAND, 2003; JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012). In general, pressurized proteins previously extracted and isolated from tissues were more sensitive to pressure than when pressurized in the intact tissue (LAKSHMANAN; PATTERSON; PIGGOTT, 2005), possibly due to stabilization by interactions with other matrix components.

As a result of HP treatment, the proteins profiles were modified as revealed by electrophoresis (CHEAH; LEDWARD, 1996; CRUZ-ROMERO et al., 2004; ORTEA et al., 2010; RAMIREZ-SUAREZ; MORRISSEY, 2006; SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006; ZHANG et al., 2015). Missing bands may be related to the denaturation and reduction of the solubility and consequent reduction in pumping capacity, while the intensification of bands can be due to higher extraction rates.

It was observed that myosin heavy chain, actin, and tropomyosin subunit bands from chicken muscle increased in intensity up to 200 MPa, with further weakening up to 500 MPa (ZHANG et al., 2015). The authors have suggested that the intensification of the bands are due to release of protein aggregates (myosin, tropomyosin, and actomyosin), while the

subsequent reduction of bands may be due to denaturation, insolubilization, and aggregation of proteins. Similarly, low molecular weight protein bands (15-37 KDa) extracted from bovine proteins exhibited progressive increase with pressure (100-400 MPa), while high molecular weight bands (205 KDa) were stable (< 200 MPa), and subsequently became weaker (> 300 MPa) (LEE, E. et al., 2007). It is suggested that HP can lead to increased solubilization of actin and myosin up to 200 MPa, possibly due to the release of low molecular weight proteins (troponin-T and C, tropomyosin, and myosin light chain), and subsequent insolubility (> 300 MPa) due to aggregation of proteins of higher molecular weight (myosin heavy chain, and actin).

The results provided by Differential Scanning Calorimetry (DSC) technique of fish meat exhibit overlapping of several peaks, and typically four of them are attributed to myosin, actin, sarcoplasmic proteins, and collagen, and their order, temperature, and intensity vary between species (ANGSUPANICH; EDDE; LEDWARD, 1999; ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998; CHEVALIER; BAIL; GHOUL, 2001; HEDGES; GOODBAND, 2003; JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012; SCHUBRING et al., 2003). HP treated fish samples often show a gradual reduction and disappearance of peaks, and usually myosin-related peaks are more sensitive to higher pressures, followed by actin and sarcoplasmic proteins. Some authors have used this technique to understand the effects on the quality of cod meat (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998; HEDGES; GOODBAND, 2003), tilapia (HSU; KO, 2001), cod, herring, ocean perch, red fish, saithe, trout, whiting, and salmon (SCHUBRING, 2005; SCHUBRING et al., 2003). For example, the lower drip loss of pressurized in comparison to heated shrimp related to the reduced protein denaturation resulting from heating, as shown in thermograms from both treatments (JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012). Moreover, comparison between texture profiles and thermograms of pressurized cod indicates the influence of myosin denaturation on decreasing adhesiveness, gumminess and cohesiveness, and actin denaturation on increasing gumminess, hardness and adhesiveness (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998).

The electrophoresis and DSC techniques reveal that besides the denaturation of actin, myosin, and sarcoplasmic proteins, the HP processing also leads to the formation of new aggregates (ANGSUPANICH; EDDE; LEDWARD, 1999; CHEVALIER; BAIL; GHOUL, 2001; JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012; SCHUBRING, 2005; SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006). Although the denaturation of bovine myosin (< 200 MPa) is due to the release of myosin light chain, aggregation of myosin heavy chain is observed from 300 MPa (LEE, E. et al., 2007). Turkey breast subjected to HP processing exhibited a new aggregate in the pressurized protein extract, which was not detected in the isolated myofibril (ANGSUPANICH; EDDE; LEDWARD, 1999), suggesting that the formation of a new aggregate is due to the interaction between myofibrillar proteins and other fractions, including sarcoplasmic proteins. This hypothesis is supported by the reduction of sarcoplasmic protein content in salmon with increased pressure (ORTEA et al., 2010). It should be noted that, once formed, the new aggregates remained stable in higher pressure levels, suggesting a stabilization by hydrogen and disulfide bonding (JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012; ZHANG et al., 2015).

Since the organization of fibers in the muscle tissue is well known, the HP effects can be observed by analyzing such arrangement. The fibers' organization in the tissue *in natura* is influenced by surrounding connective tissue (epimysium, perimysium, and endomysium), which is rich in collagen. The first researches that have assessed HP effect on collagen carried out in the 1990s demonstrated that intramuscular collagen from pressurized beef (100-300

MPa / 5 min) did not differ from the control sample over ultrastructure, electrophoretic pattern, thermal properties, suggesting that HP did not have any significant effect on connective tissue (UENO; IKEUCHI; SUZUKI, 1999). However, it was observed in blue fish that 100 MPa / 30 min caused tissue compression without structure alteration, but at 200 and 300 / 30 min it caused a breakdown or desintegration at the level of the epimysial and perimysial connective tissues networks (ASHIE; SIMPSON; RAMASWAMY, 1997). Differences in these results might be related to differences in holding times (six times higher in blue fish), pressure levels, or difference between collagen contents and compositions from mammals (land animals) and seafood (LISTRAT et al., 2016).

Pressurization of red abalones at 500-550 MPa / 3-8 min (BRIONES-LABARCA et al., 2012), and bay scallop at 200-400 MPa / 5 and 10 min (PEREZ-WON; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005) caused reduction size of the holes surrounded by endomysium, showing a size reduction of myofibers and loss of honeycomb structure, generating perimysium rearrangements with global compression of the structure which increased with the intensity of the treatment. On sea bass, at 100 MPa / 5 min, the appearance of the fibers had not changed, but from 200 MPa / 5 min up to 500 MPa more fibers look tightened and round, and the extracellular spaces decreased with pressure increase (CHÉRET et al., 2005). In pressurized smoked salmon (400-900 MPa / 10-60 s), although it has been observed in the same way of fibers compression with increase of pressure level or holding time, there was an increase in the space among the fibers as the intensity of the treatment increased, mainly by enhancing the holding time (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010). In none of the cited studies were specific mechanisms of HP action on collagen discussed.

At cellular level, it is possible to observe formation of aggregates, protein gelation, contraction of the sarcomeres, and variation in filamentous sarcomeres (changes in band A and band I), which was progressively more intense with increased pressure from 100 to 400 MPa (ASHIE; SIMPSON, 1996; HSU; KO, 2001; HURTADO et al., 2001; YOSHIOKA; YAMAMOTO, 1998).

The quality properties of fish meat and land animals primarily depend on preservation of proteins and their interactions with other tissue components, especially water. Considering the impact of HP processing on proteins, it can be expected that the effects of HP over other meat quality properties are due to changes in proteins, as shown in Figure 1.

3.2 Effects of HP on Protein Oxidation

As previously demonstrated, most researches investigate HP effects on proteins spatial conformation. Recently, there have been a growing number of published papers that investigate protein oxidation in meat and fishes caused by HP. Interest in protein oxidation under pressure is related to the potential formation of free radical acting as initiation of various oxidation reaction (pigments or lipids) thus forming off flavors and reducing nutritional value through essential amino acids degradation and reduction of protein digestibility (GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016).

While lipid oxidation starts by the formation of free radicals on unsaturated chains of fatty acids, the oxidative process in proteins starts in protein backbone and / or amino acid side chains. Mainly involving the amino acids lysine, arginine, and proline, the initiation phase occurs with the formation of a free radical with the abstraction of a hydrogen atom from the carbon next to the amino group of the side chains. This event is catalyzed by free metals,

oxygen, free radicals, pigments, and reactive oxygen species (superoxide, hydroperoxyl, hydroxyl, hydrogen peroxide, and hydroperoxides) (ESTÉVEZ, 2011).

Among the main ways to investigate the occurrence of protein oxidation, the decrease of thiol content and carbonyls formation are the most used. Although some amino acids (tyrosine and tryptophan) do not form carbonyls when oxidized, and that the carbonyls can be formed from alternative paths (nonenzymatic glycation, oxidative cleavage, and covalent binding to nonprotein carbonyl compounds such as 4-hydroxy-2-nonenal or malondialdehyde), it has been widely used as an indicator of protein oxidation (ESTÉVEZ, 2011). The disappearance of the thiol group is due to disulfide bonds formations occurring from the approach between sulfhydryl groups followed by oxidation, and are widely used to complement oxidation assessments exhibiting good correlation with carbonyls formation (DELLES; XIONG, 2014).

The assessment of protein oxidation by HP in fishes indicate that on threadfin bream at 200, 400 and 600 MPa / 10, 30 and 50 min (ZHOU et al., 2014), and on tilapia at 50-200 MPa / 0-60 min (KO, W. C.; JAO; HSU, 2003), or 50 and 300 MPa / 10-60 min (HWANG; LAI; HSU, 2007) occurs, a decrease of total sulfhydryl content (including sulfhydryl groups both exposed on the surface and buried in the proteins) of actomyosin when increasing pressure levels and holding time. Both authors related this result to formation of disulfide bonds through oxidation of thiol (SH) groups. However, the effect of reactive surface sulfhydryl content seems to be influenced by fish species and / or treatment intensity. In both studies with tilapia, whose pressurization occurred at 200 or 300 MPa, was observed an increase of the reactive surface sulfhydryl content together with pressure and holding time raise, which was assigned to alterations on protein conformation promoting greater exposure of this group that was originally buried. About threadfin bream, there was a decrease in these groups' content at lower pressure levels (200 MPa; 400 MPa / 10 and 30 min), and an increase at more intense treatments (600 MPa / 30 and 50 min). The authors of this research suggest that this reduction might be related to exposure and oxidation rate of the sulfhydryls groups. A similar behavior observed on tilapias occurs on myofibrillar protein of pressurized chicken (100-500 MPa / 10 min), when, also observed, is a decrease of total content and an increase of reactive content sulfhydryl with rise in pressure levels (ZHANG et al., 2015).

Cava *et al.* (2009) have evaluated the carbonyls' formation on pressurized, sliced, dry-cured ham and loin (200 and 300 MPa / 15 and 30 min), and observed the stability of both products to oxidation caused by HP. With exception of the sliced, dry-cured, loin pressurized at 300 MPa / 30 min, which exhibited an increase on the carbonyls content, HP did not influence this group formation in both products compared to the control sample not pressurized. The authors attributed the observed oxidative stability to the low water activity on the products, what hinders mobility and contact between oxidant agents and oxidation sites. However, considering that the sliced dry-cured ham can exhibit a rise on carbonyls content when pressurized by 600 MPa / 6 min (FUENTES et al., 2010), it is possible that the pressure levels assessed by this research might have been lower than the needed threshold to protein oxidation catalysis.

Another way to assess the formation of carbonyls groups is the quantification of α -amino adipic semialdehyde and γ -glutaminic semialdehyde. These compounds are formed through oxidative deamination of the original amino acids, namely lysine, proline, and arginine, and are considered as good oxidation indicators since they express the most part of the carbonyls groups on food (ESTÉVEZ, 2011). Fuentes *et al.* (2010) evaluated these

compounds' formation on dry-cured ham and observed that the concentration of both compounds had risen after pressurization (600 MPa / 6 min / 12 °C). In this same research, it was observed that the dry-cured ham, pressurized in sliced format, exhibited higher concentrations of both compounds when compared to dry-cured ham pressurized in intact format (not sliced), suggesting a potential tissue's rupture and / or of oxygen and UV light on these compounds' formation.

Grossi *et al.* (2014) investigated HP influence (600 MPa / 6 min) at protein oxidation of pork meat previously brined (5.5 % NaCl). It was observed that thiol groups contents were not influenced by HP immediately after treatment and these results are attributed to the high content of thiol groups that were already exposed before the pressure treatment, which may have made the exposure of additional groups negligible. The hypothesis of an oxidation before the pressure treatment was reinforced by the high content of sulfhydryl groups on the control samples. In addition, the authors observed that the carbonyls content decreased during storage time (2 °C for 8 weeks), and the thiol groups content decreased on sarcoplasmatic proteins and increased on myofibrillar proteins. Variations in the thiols' contents were related to additional oxidation during storage (content decrease), and to an increase in the activity of reducing enzymes (content increased). The gain on the thiol group's content as HP's effect might not be related to breaking of the disulfide bonds, since it is a reaction that requires much more energy than that involved in HP (ZHANG *et al.*, 2015). The decrease in the carbonyls' content might be related to its decomposition because they react further either by cross-linking to form Schiff-base or oxidation into carboxylic acid (ESTÉVEZ, 2011).

Once the carbonyls formation passes through the free radicals formation, the assessment of these reactive species formation helps in understanding the mechanism involved. Bolumar, Andersen, & Orlien (2014) investigated the generation of free radicals on protein fractions of pressurized beef loin and chicken (800 MPa / 10 min). The HP promoted free radicals formation was more intensely seen on the beef loin (higher pigment and total fat contents) than chicken (higher unsaturated fat). Among the protein fractions of the beef loin, was observed the generation of free radicals on sarcoplasmatic and myofibrillar portions and insoluble protein fractions as a consequence of HP, being more intense on the insoluble protein fraction. Moreover, in this same research, it was demonstrated that, concerning free radicals formation, Fe²⁺ addition potentialized and EDTA addition inhibited their formation. Those radicals might act by inducing oxidative catalysis of other protein chains, or even migrating to other sites and inducing lipid and pigments oxidation.

The effects of HP on lipid oxidation and color of fish will be discussed below. Considering the similarities between these processes, it is expected that each one potentiates the other's occurrence, and might occur simultaneously or sequentially. Some review papers describe in detail the interaction between lipid and protein oxidation (GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016), and lipid and pigments oxidation (FAUSTMAN *et al.*, 2010), and Figure 1 illustrates all those process.

3.3 Effects of HP on Lipid Oxidation

Fish are rich in polyunsaturated fatty acids, heme-containing protein such as hemoglobin, and pro-oxidants such as transition metals and enzymes, and therefore, highly susceptible to oxidation. Research studied lipid oxidation in pressurized fish using the TBA method (thiobarbituric acid), capable of quantifying secondary oxidation products, especially malondialdehyde. The formation of free fatty acids (FFA), although it is not a direct

indication of oxidation, has been also investigated, since the unesterified fatty acids are more susceptible to autoxidation. However, there is a great interest on the fatty acid profile to assess the stability of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, known to be beneficial to human health. Decrease in polyunsaturated fatty acids concentration may be observed clearly in advanced stages of oxidation, which generally are counterbalanced by an increase in saturated fatty acids concentration (GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016). In addition, the formation of compounds derived from cholesterol oxidation is gaining importance for the toxicological potential of these compounds (SALDANHA; BENASSI; BRAGAGNOLO, 2008).

The effects of HP on lipid oxidation may vary with different factors such as pressure level, process time, fiber type, age, chemical composition, fat profile, handling ante- and postmortem, and preprocesses among others (TRUONG et al., 2015). It is expected that meat coming from older animals exhibit greater sensitivity to HP due to increased formation of free radicals in red meat (related to higher pigment content and unsaturated fat), and the fact that older animals accumulate more pro-oxidants (such as H₂O₂) (BOLUMAR; ANDERSEN; ORLIEN, 2014). Minced samples may exhibit greater sensitivity to HP due to higher exposure to oxygen, increased interaction between pro-oxidants and their targets, and rupture of cell membranes, which causes leakage and spreading of pro-oxidants (BELTRAN et al., 2004). On the other hand, smoked fish exhibit greater stability to lipid oxidation after pressurization, possibly due to antioxidants coming from smoke (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; YAGIZ et al., 2009).

It is found that HP has stronger catalytic oxidation power from 300 MPa (MEDINA-MEZA; BARNABA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2014), although higher TBA levels were observed from 150 to 300 MPa in bonito fish (WADA; OGAWA, 1996), salmon (AMANATIDOU, 2000; LAKSHMANAN; MISKIN; PIGGOTT, 2005), cod (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998), carp (SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006), mahi-mahi (YAGIZ et al., 2007), and sea bass (TEIXEIRA; FIDALGO et al., 2014), with good correlation between pressure and pressurization time (BINDU et al., 2013; CHEAH; LEDWARD, 1996; SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006). However, other fish such as smoked cod (MONTIEL et al., 2012) and abalone (JO et al., 2014) presented constant TBA values after pressurization, while lower TBA values were observed for tuna (RAMIREZ-SUAREZ; MORRISSEY, 2006).

Lipid oxidation is not due to a direct effect of pressure on lipids, but rather to the combined action of oxygen and catalyst as metal ions, proteins or enzymes (Medina-Meza et al., 2014). It is possible that the animal fat isolated is stable to oxidation up to 600-800 MPa, therefore, the oxidation in pressurized meat and fish is mainly due to the activity of one or more compounds in tissues, such as proteins, pigments and / or metal (CHEFTEL; CULIOLI, 1997). HP treatments induced a modification of the melting temperature of triacylglycerols, reported to be of 10 °C / 100 MPa, leading to modifying the solid fat content of the product after pressurization (MEDINA-MEZA; BARNABA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2014). This effect is due to alignment of triacylglycerol-forming fatty acid chains (acyl groups) resulting in a lateral shrinking and an increase in thickness, which cause a state transition from liquid-crystalline to the gel phase (RIVALAIN; ROQUAIN; DEMAZEAU, 2010; WINTER; JEWORREK, 2009). Schaschke, Allio & Holmberg (2006) observed an increase in viscosity of olive oil pressurized up to 160 MPa and relate the viscosity to a better molecular packing. This phenomenon can affect membrane stability and / or mobility of compounds (pro- and

antioxidants, for example), besides influencing catalysis in the oxidation processes (GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016).

Lipid oxidation can be initiated at pressure inducing denaturation of proteins making available catalytic compounds such as iron, heme compounds (BELTRAN et al., 2004; BINDU et al., 2013; CHEAH; LEDWARD, 1996; LAKSHMANAN; MISKIN; PIGGOTT, 2005; MA et al., 2007; YAGIZ et al., 2007). It is well known that the free metals, especially iron, are closely related to oxidation caused by HP, since meat with higher Fe levels are more sensitive, and those with lower content or containing metal chelators, such as EDTA, are considered sufficiently stable (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998; BELTRAN et al., 2004; HE, Z. et al., 2012; MA et al., 2007). For example, while beef cuts begin to oxidize at 200 MPa or less (MA et al., 2007) chicken breast was considered stable up to 400-500 MPa (BELTRAN et al., 2004; ORLIEN; HANSEN; SKIBSTED, 2000). However, the enrichment of muscle with α -tocopherol antioxidant can enhance lipid oxidation (by increasing TBA value) in meat pressurized at 200 or 800 MPa / 20 min (TUME, SIKES, & SMITH, 2010).

Free radicals acting in lipid oxidation come from autoxidation of lipids catalyzed by pro-oxidants, or from protein oxidation, as recently discussed. In a recent review, Guyon *et al.* (2016) have discussed the possible interrelationship between the protein oxidation and lipid oxidation processes. According to the authors, oxidation routes of both fractions are very similar, so that both processes can be started the same way and pass through the formation of free radicals. By considering that oxidation reactions occur in the chain and exhibit very similar phases in the two processes, is possible that the radical formed in a given site can act in the oxidation of the other if the reactive species is spatially close. Bolumar et al. (2014) demonstrated the formation of free radicals caused by HP in myofibrillar, sarcoplasmic, and insoluble fractions of beef and chicken, and suggested that these compounds can migrate to lipid fraction and induce oxidation. The same study found that the formation of radicals in protein fractions of beef (287 mmol / kg myoglobin) was higher than in chicken (126 mmol / kg myoglobin), and the addition of iron improves the formation of these compounds, while EDTA prevents such process.

Although several studies have reported an association between the catalytic power of iron and induction of oxidation in meat and fish that are subjected to HP, the mechanism is not well understood. It is possible that lipid oxidation observed at high pressure levels (higher than 400 MPa) can be related to the disruption of cellular membranes (CAMPUS, 2010; MEDINA-MEZA; BARNABA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2014), which are responsible for the exposure of unsaturated lipids to enzymes (phospholipase, lipoxygenase, cytochrome P450 family, and others) and metal catalysts (heme and nonheme iron and other metals), favoring oxidation reactions (BAJOVIC; BOLUMAR; HEINZ, 2012; BOLUMAR; ANDERSEN; ORLIEN, 2014). In addition, HP can increase the exposure and interaction of heme-iron to the unsaturated fatty acids, which is more important than the release of metals (SCHINDLER et al., 2010).

The presence of oxygen during pressurization enhances oxidation. Ground pork and pressurized cod have increased TBA with pressure level in the presence of air (mainly from 200 MPa); however, when pressurized under N₂ atmosphere, the TBA levels were similar to the unpressurized sample for all pressure levels (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998; CHEAH; LEDWARD, 1996). Therefore, the pressurization condition in absence of oxygen (vacuum packaging), as carried out in most cases, contributes to prevent the effect of pressure on the oxidation process (MARIUTTI et al., 2008)

Studies on turbot (CHEVALIER; BAIL; GHOUL, 2001), salmon (ORTEA et al., 2010), shrimp (KAUR et al., 2013) and mackerel (FIGUEIREDO et al., 2015) found no effects of HP on the formation of free fatty acids (FFA), suggesting that the hydrolysis mechanism of fatty acids is not influenced by HP. However, horse mackerel (TORRES et al., 2013) exhibit an increase in FFA concentration with significant correlation with pressure level (150, 300, and 450 MPa) and holding time (0, 2.5 and 5.0 min). A similar phenomenon was also observed in carp (SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006) pressurized between 100 and 200 MPa / 15 and 30 min. The increase in FFA concentration might be related to myofibrillar proteins unfolding and disruption of interactions between FFAs and these proteins caused by HP. According to Shenouda (1980), the FFA and myofibrillar proteins interact with each other through electrostatic, van der Waals, hydrogen bonding and hydrophobic forces, which contribute to a reduction of proteins extractability. However, mackerel (150, 300, and 450 MPa / 0, 1 and 3 min) and cod (202, 405, and 608 MPa / 15 and 30 min) pressurized exhibit a decreased in FFA concentration and was related to inactivate lipolytic enzymes (OHSHIMA; USHIO; KOIZUMI, 1993; VÁZQUEZ et al., 2013). Although, in another study HP (207, 242, 276, and 311 MPa / 0, 1 and 2 min) did not show significant inhibitory effects on lipase activity (HE et al., 2002).

According to the few studies about the effects of HP on the fatty acid profile of pressurized meat and fish, it is possible that there is no effect on the composition of this lipid fraction. Beef subjected to 200-600 MPa (MCARDLE et al., 2010) and chicken to 400-600 MPa (SCHINDLER et al., 2010), were stable to the process, especially with respect to the unsaturated / saturated fatty acid (U:S), and n-6 / n-3 ratios. Oysters (CRUZ-ROMERO; KELLY; KERRY, 2007), and salmon (YAGIZ et al., 2009) subjected to HP treatments exhibited saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, concentrations of eicosapentaenoic fatty acids (EPA), and docosahexaenoic (DHA), U:S and n-6 / n-3 ratios stable to processing conditions. Discrete effect was observed only in salmon (300 MPa / 15 min), which exhibited lower n-6 levels, with consequent reduction of n-6 / n-3 ratio.

Little research has evaluated the formation of cholesterol oxide in meat, fish, and other related products after HP treatment. Cholesterol oxides have been detected in pressurized ham (CLARIANA; GARCÍA-REGUEIRO, 2011) and turkey meat, with a limit pressure of 200-300 MPa for the formation of oxides (TUBOLY et al., 2003). Pressurization (600 MPa / 10 min) of mackerel and herring has not changed the concentration of cholesterol, however, mackerel showed higher cholesterol oxidation products (FIGUEIREDO et al., 2015). It is possible that cholesterol oxidation may be due to breakage of cell structures and exposure of phospholipids membrane (MEDINA-MEZA; BARNABA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2014).

3.4 Effects of HP on Color Parameters

Understanding the HP effects on fish color is essential, since this is one of the key attributes for assessing the freshness, with great impact on the purchase decision of consumers (TRUONG et al., 2015). Color measurements in pressurized fish are recurrent, and the CIELAB system is widely used, in which the color is expressed as a three-dimensional diagram composed of L* planes (brightness scale from 0 (black) to 100 (white)), a* (scale ranging from -a (green) and +a (red)), and b* (scale ranging from -b (blue) and +b (yellow)). From these parameters, ΔE^* (which is used to predict the differences in perception capacity: $\Delta E > 3.0$ = very distinctive, $1.5 < \Delta E < 3.0$ = distinct, and $\Delta E < 1.5$ = slightly distinct (ADEKUNTE et al., 2010)), C* (chroma, suggesting saturation, or "vivacity"), h (hue angle, perceived color) and WI (whiteness index), can be calculated.

There is consensus that the L^* parameter increases in pressurized fish, which is more clear, gray, typical of cooked meat aspect when subjected to 150-300 MPa (CHÉRET et al., 2005; CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008; JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012; JO et al., 2014; KAUR et al., 2013; SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006; TRUONG et al., 2015; YAGIZ et al., 2007). Although there are some differences between the results, most studies have shown the decrease in a^* (loss of red) and increase in b^* (up yellow), which varies with the species and the pressurization parameters. The total color change tends to increase with HP treatment, with value of 6.5 in oyster subjected to 400 MPa / 5 min (CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008), and 11.90 in abalone pressurized to 500 MPa / 3 min (JO et al., 2014). Table 2 presents a summary of the main effects of HP on fish color.

It is possible that the increase in L^* parameters depends only on the intensity of HP process (pressure and time), and may be associated with globin and myofibrillar denaturation. In contrast, changing the color coordinate a^* may be related to oxidation reactions, therefore, the presence of oxygen in the medium may be an important factor (AMANATIDOU, 2000; CARLEZ; VECIANA-NOGUES; CHEFTEL, 1995).

The mechanisms and or reactions leading to color changes after HP were not fully elucidated. The final color may be the result of various contributing factors, as changes in pigments, muscle hydration status, state of myofibrillar and sarcoplasmic proteins (native or denatured), and the extent of lipids and proteins oxidation could also impact the other factors (GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016; MEDINA-MEZA; BARNABA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2014). Seafood like salmon and shrimp, yellow to orange in color, exhibit this color due to astaxanthin and, in lower quantities, canthaxanthin and beta carotene. The astaxanthin occurs naturally in tissues in its free form, lipid esterified and complexed with proteins (carotenoprotein), and changes in these structures cause meat whitening. The discoloration caused by HP (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012) can be attributed to unfolding of proteins that are complexed to the pigment (TRUONG et al., 2015) or to the pigment oxidation that, in this case, is more sensitive at free form (BREITHAUPT, 2004; TINTCHEV et al., 2010).

Red meat fishes are rich in myoglobin pigment, which is a hemo-protein composed by the globin and the prosthetic group porphyrin (with highly unsaturated ring, and a central iron atom). Three main mechanisms can lead to color changes (1) protein (globin) denaturation with possible heme release; (2) changes in the porphyrin ring with possible iron release; and (3) oxidation of iron (ferrous to ferric) (CARLEZ; VECIANA-NOGUES; CHEFTEL, 1995). These authors suggest that 200-350 MPa / 10 min are sufficient for globin denaturation, while 400 MPa / 10 min is necessary for iron release and oxidation.

Color alterations caused by protein unfolding may evolve and stabilize as this process advances. Pressurized pork meat (myoglobin rich) from 200-800 MPa / 10 min exhibits a similar behavior with an increase in L^* and reflectance spectrum alterations (which is a protein unfolding indicator) until 400 MPa / 10 min, and after this pressure level, both parameters are constant (BAK et al., 2012). Shrimp (rich in carotenoid pigments) may exhibit a higher L^* compared to control sample, and constant from 200 to 800 MPa (JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012), or similar to the control sample until 100 MPa / 5 min and higher and constant from 270 to 435 MPa / 5 min (Kaur et al., 2013). Oysters exhibit L^* , a^* , and b^* stable and higher than the control sample when

Table 2 – Effect of the HP process on fish and seafood meat color.

Seafood	L	A	B	C	h	ΔE	WI	Reference
<i>Fish</i>								
Bluefish	↑ (ΔP and Δt)	↓ (ΔP and Δt)	↑ (ΔP and Δt)	-----	-----	↑ (ΔP and Δt)	-----	ASHIE & SIMPSON, 1996
Carp	↑ (ΔP and Δt)	↑ (ΔP)	↑ (ΔP and Δt)	-----	-----	↑ (ΔP and Δt)	-----	SEQUEIRA-MUNOZ ET AL., 2006
Cod	↑	Variable	No effect	-----	-----	-----	-----	MONTIEL et al., 2012
Mahi-Mahi	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	Variable	-----	-----	-----	-----	YAGIZ et al., 2007
Raimbow trout	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	Variable	-----	-----	-----	-----	YAGIZ et al., 2007
Red mullet	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	↑ (ΔP)	-----	-----	↑ (ΔP and Δt)	-----	ERKAN et al., 2010
Salmon (fresh)	↑ (ΔP and Δt)	↓ (ΔP and Δt)	-----	-----	-----	-----	-----	AMANATIDOU, 2000
Salmon (smoked)	↑ (ΔP and Δt)	No effect	↑ (ΔP)	-----	-----	-----	-----	LAKSHMANAN et al., 2005
Salmon (smoked)	↑ (ΔP)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010
Sea bass	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	No effect	-----	-----	-----	-----	CHÉRET et al., 2005
Sea bass	-----	-----	-----	↓ (ΔP)	↑ (ΔP)	-----	↑(ΔP)	TEIXEIRA et al., 2014
Tuna	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	↑ (ΔP)	-----	↑ (ΔP)	-----	↑(ΔP)	RAMIREZ-SUAREZ & MORRISSEY, 2006
Turbot	↑ (ΔP and Δt)	Variable	↑ (ΔP and Δt)	-----	-----	-----	-----	CHEVALIER et al., 2001
<i>Molluscs</i>								
Abalone	↑ (ΔP)	No effect ¹	No effect	-----	-----	↑ (ΔP)	-----	JO et al., 2014
Abalone	Variable ²	Variable	Variable	-----	-----	-----	Variable	BRIONES-LABARCA et al., 2012
Oyster	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	↑ (ΔP)	-----	-----	↑ (ΔP and Δt)	-----	CRUZ-ROMERO et al., 2004
Oyster	↑ (ΔP)	↑ (ΔP)	↑ (ΔP)	↑ (ΔP)	No effect	↑ (ΔP)	-----	CRUZ-ROMERO et al., 2008

Continues

Table 2 – Continuation

Oyster	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	↓ (ΔP)	-----	-----	↓ (ΔP)	-----	PEREZ-WON et al., 2005
<i>Crustaceans</i>								
Shrimp	↑ (ΔP)	↑ (ΔP)	↑ (ΔP)	-----	-----	-----	-----	JANTAKOSON et al., 2012
Shrimp	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	↑ (ΔP)	-----	-----	-----	-----	BINDU et al., 2013
Shrimp	↑ (ΔP)	↓ (ΔP)	↑ (ΔP)	-----	-----	-----	-----	KAUR et al., 2013

* ↑ and ↓: increase or decrease in color index as a function of HP processing parameters

** Term in parentheses – (ΔP): pressure and (Δt): time – expresses the parameter of the HP process that influenced the changes in color index

¹ No effect: no detectable effect of HP process

² Variable: color index influenced by HP, however, with no clear correlation with processing parameter

pressurized at 200, 400, and 600 MPa / 5 min (CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008). The authors of these papers relate changes of color indexes to unfolding of myofibrillar and / or sarcoplasmatic proteins. The pressure limit and the extent of color changes are related to the fish species.

The myoglobin unfolding caused by HP may be influenced by other matrix components. In a published review by Ma & Ledward (2013), researchers demonstrated that myoglobin unfolding in a diluted solution may be reversible. However, the pigment in meat precipitates in an insoluble complex suggesting coprecipitation with other proteins.

Still about seafood meat rich in myoglobin, the use of high pressure has been related to changes in the pigment's shape. In red meat *in natura*, pigments occur in three main shapes: (1) deoxymyoglobin: pigment purple red characterized by water in 6th coordinate, and iron in state Fe^{2+} ; (2) oxymyoglobin, pigment bright red characterized by oxygen in 6th coordinate, and iron in state Fe^{2+} ; and (3) metmyoglobin: brown pigment characterized by water in 6th coordinate, and oxidate iron in state Fe^{3+} ; in addition, in processed meat, the ferrohemochrome pigment (red color pigment derived from unfolding of the protein fraction (globin) of oxymyoglobin or deoxymyoglobin) and ferrihemochrome (brown pigment derived from the ferrohemochrome oxidation) may be observed (KING; WHYTE, 2006). Bak et al. (2012) verified a predominance of deoxymyoglobin until 200-250 MPa / 5 min in pork meat, but after 300 MPa until 800 MPa this pigment may possibly have been modified to ferrohemochrome. Carlez et al. (1995) observed an increase in metmyoglobin at the expense of oxymyoglobin in beef pressurized at 400 and 500 MPa / 10 min. Similarly, Bolumar et al. (2014) observed a decrease in oxymyoglobin in detriment to the increase of metmyoglobin with pressurization of meat from chicken and beef.

It is not expected that HP directly causes pigment oxidation (conversion of oxymyoglobin or deoxymyoglobin to metmyoglobin through iron direct oxidation). However, it is possible that this is an indirect effect as a consequence of an increase in oxidizing potential of the medium. Changes in color related to pigment oxidation exhibit a close relationship with another oxidative processes that may occur in pressurized meat fish, such as lipid and protein oxidation. The oxidative routes exhibit similar mechanisms (Figure 1), and in this way, it is possible that these oxidations may potentiate each other. It is possible that the oxidation of oxymyoglobin to metmyoglobin produces reactive intermediates, which in addition to accelerating the oxidation of new myoglobin molecules can also act in the oxidation of unsaturated fatty acids and proteins (FAUSTMAN et al., 2010). Similarly, the trigger for pigment oxidation may be the primary or secondary products of lipid oxidation, or free radicals formed in the initial phases of lipid or protein oxidations (GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016). Additionally, all these oxidation processes are catalyzed by the presence of free metals, and the release of these metals can be enhanced by HP (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998; CHEFTEL; CULIOLI, 1997).

3.5 Effects of HP on Parameters of Texture

Instrumental texture in pressurized fish can be measured by two methods: shear force test, and compression force, with a great variety of different probes and testing parameters. Although most research uses Warner Bratzler shear type blade in the shear force test, they differ in test speed, equipment used, and temperature among others. In the compression test, there is a great variety of probes (cylindrical and spherical with various diameters), and

sample preparations with different geometric shapes and temperatures can also be a process variable. Table 3 presents the main methodologies and results for application of HP in fish. The great variability of methodologies requires that information is reviewed with caution. Hardness obtained in the compression force test is one of the primary endpoints, with an increase observed in HP-treated tuna (RAMIREZ-SUAREZ; MORRISSEY, 2006), trout and mahi-mahi (YAGIZ et al., 2007), salmon (YAGIZ et al., 2009), salmon, cod, and trout (SCHUBRING et al., 2003), marinated shrimp ready to eat (YI; ZHANG et al., 2013), bay scallop (YI; XU et al., 2013), black tiger shrimp (KAUR et al., 2013), and white prawn (BINDU et al., 2013). However, carp showed an increase in hardness at 100 MPa, with lower values at 200 and 300 MPa (YOSHIOKA; YAMADA; MAKI, 1996), which was also observed for cod with maximum hardness at 400 MPa, with reduction until a value slightly higher than the control at 800 MPa (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998). Despite sea bass subjected to 100 and 300 MPa / 5 min / 10 ° C exhibited lower hardness than the control, similar values were observed when the samples were subjected to 400 and 500 MPa / 5 min / 10 ° C (CHÉRET et al., 2005). In contrast, adductor muscle of bay scallop decreased hardness when compared to the control (PEREZ-WON; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), while red abalones were stable to HP processing (BRIONES-LABARCA et al., 2012)

Shear force test also showed an increase in hardness in salmon (AMANATIDOU, 2000; LAKSHMANAN; MISKIN; PIGGOTT, 2005), oyster (CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008), smoked cod (MONTIEL et al., 2012), and abalone (JO et al., 2014). Despite the increase in oyster hardness when compared to the control, there was no difference among the pressure levels assessed. In octopus, there was a progressive reduction in hardness with increasing pressure levels (HURTADO et al., 2001), while being constant in smoked salmon (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010).

Jantakoson et al. (2012) evaluated black tiger shrimp samples of the same batch using different analysis, and found an increase in hardness by shear force at 400 MPa and over, and by compression force from and beyond 600 MPa. Among those pressure levels (200, 400, 600, and 800 MPa), the shear force test was able to discriminate among treatments, so that 600 and 800 MPa presented greater hardness than 200 MPa. No significant differences between treatments were detected by the compression force test.

Table 3 – Results of research with HP on the texture of seafood

Seafood	Sample	Pressure treatments	Method	Main effects	Reference
<i>Compressive test</i>					
<i>Fish</i>					
Bluefish	30 x 15 x 20 mm	100, 200, and 300 MPa / 30 min	Speed of 20 mm/min. Maximum load of 45 N.	Strength and elasticity dependent on both the pressure applied and holding time	ASHIE & SIMPSON, 1996
Cod	20 x 20 x 15 mm	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / RT	Cylindrical-shaped piston, Ø= 38mm, speed of 2 mm/s. Sample compressed to 50 %	Small effect on cohesiveness and springiness. Sharp decrease in adhesiveness at 200 MPa, and some loss of gumminess at 400 and 600 MPa. Chewiness and hardness at 400 and 600 MPa increased significantly, and dropped after treatment at 800 MPa.	ANGSUPAN ICH & LEDWARD, 1998
	20 x 20 x 15 mm	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / RT	Sample (20 °C), compressed to 50%, speed of 2 mm/s, cylindrical-shaped piston Ø= 38 mm	Pressurized sample (400 MPa) showed more hardness than the control sample	ANGSUPAN ICH et al., 1999
	Cylinder 20 mm diameter	200 MPa (thawing)	Flat-ended probe (Ø= 50 mm) at speed of 1.7 mm/s	Texture was influenced by HP-assisted thawing. Hardness at 75% compression was higher in pressurized samples, when compared to the conventionally thawed fillet, except for redfish and rainbow trout.	SCHUBRING et al., 2003

Continues

Table 3 – Continuation

	Hardness: 65 x 20 x 10 mm Shear Strength: 50 x 30 x 10 mm	400, 500, and 600 MPa / 5 and 10 min	Hardness (N) was measured using a Kramer cell, and shear strength (N) was measured using a Warner-Bratzler blade	HP treatment increased hardness when determined with the Kramer cell, and shear strength when determined with Warner-Bratzler	MONTIEL et al., 2012
Mahi-Mahi	20 × 20 × 15 mm	150, 300, 450, and 600 MPa / 15 min / RT	Sample (4 °C) was compressed twice to 70% of its original height at 100 mm/min speed, and 100 Newton compression load using a cylindrical-shaped probe (Ø= 38 mm)	The control mahi-mahi had the lowest hardness value of all treated samples. Chewiness and gumminess increased as pressure increased for both species.	YAGIZ et al., 2007
Rainbow trout	20 × 20 × 10 mm	150, 300, 450, and 600 MPa / 15 min / RT	Sample (4 °C) was compressed twice to 70% of its original height at 100 mm/min speed, and 100 Newton compression load using a cylindrical-shaped probe (Ø= 38 mm)	Rainbow trout subjected to 450 and 600 MPa presented higher hardness, with no significant difference between 0.1 and 150 MPa. Cohesiveness was higher for the samples subjected to higher pressure levels.	YAGIZ et al., 2007
	Cylinder 20 mm diameter	200 MPa (thawing)	Flat-ended probe (Ø= 50 mm) at speed of 1.7 mm/s	Texture was influenced by HP-assisted thawing. Hardness at 75% compression was higher in pressurized samples, when compared to the conventionally thawed fillet, except for redfish and Rainbow trout.	SCHUBRING et al., 2003
Redfish	Cylinder 20 mm diameter	200 MPa (thawing)	Flat-ended probe (Ø= 50 mm) at speed of 1.7 mm/s	Texture was influenced by HP-assisted thawing. Hardness at 75% compression was higher in pressurized samples, when compared to the conventionally thawed fillet, except for Redfish and Rainbow trout.	SCHUBRING et al., 2003

Continues

Table 3 – Continuation

Salmon	20 × 20 × 15 mm	150 and 300 MPa / 15 min	Sample (4 °C) was compressed twice to 70% of its original height at 100 mm/min speed, and 100 Newton compression load using a cylindrical-shaped probe (Ø= 38 mm)	Pressure-increased hardness, gumminess, and chewiness, and decreased adhesiveness when compared to control. No significant differences in the parameters hardness, adhesiveness, gumminess, and chewiness were observed for both the samples subjected to 150 MPa and control.	YAGIZ et al., 2009
	Cylinder 20 mm diameter	200 MPa (thawing)	Flat-ended probe (Ø= 50 mm) at speed of 1.7 mm/s	Texture was influenced by HP-assisted thawing. Hardness at 75% compression was higher in pressurized samples, when compared to the conventionally thawed fillet, except for Redfish and Rainbow trout.	SCHUBRING et al., 2003
Sea bass	Cylinder 20 mm diameter	100, 200, 300, 400, and 500 MPa / 5 min / 10 °C	Sample (20 °C) was compressed between stainless-steel plates (Ø= 40 mm) parallel to muscle fiber orientation. Speed of 1 mm/s. Load cell 50 kg.	Hardness decreased from 100 MPa to 300 MPa, and remained constant after 400 MPa and 500 MPa; cohesiveness, springiness, and resilience was almost constant. Gumminess and chewiness decreased from 100 to 300 MPa, and increased after 400 MPa and 500 MPa. TPA criteria were markedly affected by HP at about 300 MPa.	CHÉRET et al., 2005
	Cylinder 20 mm diameter	200 MPa (thawing)	Flat-ended probe (Ø= 50 mm) at speed of 1.7 mm/s	Texture was influenced by HP-assisted thawing. Hardness at 75% compression was higher in pressurized samples, when compared to the conventionally thawed fillet, except for Redfish and Rainbow trout.	SCHUBRING et al., 2003

Continues

Table 3 – Continuation

Tuna	Cylindrical minced samples: 25 mm high × 23 mm diameter	275 and 310 MPa / 2, 4 and 6 min	Compression plate (Ø= 75 mm). Speed of 2 mm/s, sample compressed 50% its original height. Load cell 5 kg.	aluminum	Pressure and holding time increased hardness.	RAMIREZ-SUAREZ & MORRISSEY, 2006
<i>Molluscs</i>						
Abalones	Cubes in 10 mm	500 MPa / 8 min; 550 MPa / 3 and 5 min (RT ¹ 20 °C)	Sample (20 °C) was compressed twice to 25% of its original thickness. Speed of 2 mm/s. Cylindrical flat-probe (Ø= 25 mm)		No significant differences were observed for hardness and springiness of the samples treated at 500 and 550 MPa when compared to the control, while cohesiveness and chewiness were higher in the treated samples.	BRIONES-LABARCA et al., 2012
Bay scallop	2.5 cm diameter; 2.0 cm length	200 and 400 MPa / 10 min / 22 °C	Sample was axially compressed with a flat plunger Ø= 50 mm. Speed of 1mm/s. Load cell 5 kg.		Hardness decreased regardless of the pressure level. Fracturability decreased at 400 MPa / 10 min. Resilience showed an increase regardless of the pressure level. No changes were observed for adhesiveness, springiness, cohesiveness	PEREZ-WON et al., 2005
		150 MPa / 2 and 3 min; 200 MPa / 0, 2 and 3 min; 300 MPa / 0, 2 and 3 min; 350 MPa / 2 and 3 min; 400 MPa / 0 min	Cylindrical aluminum probe (Ø = 50 mm). Speed of 1 mm/s, with deformation 30% of the original height.		Hardness increased at 200 MPa / 3 min and, especially, at 350 MPa / 0 min. No significant effect of HP was observed for springiness.	YI et al., 2013

Continues

Table 3 – Continuation

Crustacean

Shrimp	Second segment	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / 28 °C	Samples to 5 mm for 9 min using the cylindrical-shaped probe (Ø = 6 mm). Load Cell 25 kg.	Both compression force and shear force increased with increasing pressure	JANTAKOSON et al., 2012
	Three points of each shrimp	100, 270, and 435 / 5 min / 25° C (RT)	Sample compressed by 30 % of its original height using a cylindrical probe (Ø= 6 mm) with a test speed of 2 mm/s.	Samples treated at 100, 270, and 435 MPa were 13 %, 20 %, and 60 % harder than the untreated sample.	KAUR et al., 2013
	Second segment	550 MPa / 5 min	Cylindrical aluminum probe (Ø= 50 mm), and a 25-kg load cell. The crosshead pretest, test, and post-test speeds were 2 mm/s, 3 mm/s, and 2 mm/s, respectively. Deformation was 70% of the original height	Higher hardness and springiness was observed for all treated samples when compared to the control, with no significant differences for cohesiveness	YI et al., 2013

Method: Cutting strength

Fish

Salmon	Pieces of similar size	100, 150, and 200 MPa / 10, 30, and 60 min / 1 - 5 °C	Knife blade, speed of 2 mm/s and a cutting distance of 5 mm	Treatment of 150 or 200 MPa at 30 min increased cutting strength when compared to the untreated sample, with a strong effect after 200 MPa / 60 min.	AMANATIDOU, 2000
--------	------------------------	---	---	--	------------------

Continues

Table 3 – Continuation

Salmon	Slices of similar size	100, 150, 200, and 300 MPa / 20, 25 and 30 min / 10, 20 and 30 °C	Warner-Bratzler blade. Speed of 1 mm/s and load cell 25 kg	Pressure and temperature influenced on the cutting strength, while holding time had no effect.	LAKSHMANAN et al., 2005
Salmon	20 × 20 × 15 mm	400, 500, 600, 600, 800, and 900 MPa / 10, 20, 30, and 60 seg / RT	Warner-Bratzler shearing blade (3.21 mm x 125 mm x 70 mm). Speed of 2.5 mm/s.	No difference in toughness was observed between the control and the pressurized samples (400-900 MPa / 20 s). Samples subjected to 900 MPa / 10, 30, or 60 s were tougher than the samples processed at 400 MPa.	GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010
<i>Molluscs</i>					
Octopus	Slices 2 mm	200, 300, and 400 MPa / 15 min / 7 and 40 °C	Kramer shear cell using a maximum crosshead force of 5 kN at a rate of 100 mm/min.	Samples subjected to 200 MPa and 300 MPa exhibited higher hardness values compared to both the unpressurized control and the sample pressurized at 400 MPa.	HURTADO et al., 2001
Oyster	Ventral part	260, 400, and 600 MPa / 5 min / 20 °C 260, 500 and 800 MPa / 3 or 5 min	Knife blade operating at a speed of 2 mm/s and a cutting distance of 5 mm.	Cutting strength increased when compared to the untreated control	CRUZ-ROMERO et al., 2008
<i>Crustacean</i>					
Shrimp	Second segment	200, 400, 600, and 800 MPa / 20 min / 28 °C	Warner-Bratzler blade, speed of 2 mm/sec while perpendicular to the axis of muscle fibers.	Both compression force and shear force increased with increasing pressure	JANTAKOSON et al., 2012

Changes in texture can be directly related to the effects of HP on proteins, such as protein denaturation and aggregation, changes in actin-myosin interaction, α -actinin release, and denaturation of myofibrillar proteins (CHEVALIER; BAIL; GHOUL, 2001; GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016; YAGIZ et al., 2007). HP promotes tissue compression by forming additional protein interactions (ANGSUPANICH; EDDE; LEDWARD, 1999; JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012), with consequent compression of fibers and connective tissue rearrangement (BRIONES-LABARCA et al., 2012; HURTADO et al., 2001; PEREZ-WON; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005). The compaction of tissues and fibers caused by HP may be due to reduction of the sarcomere length, and a possible softening effect related to fragmentation of myofibrils structures can also be observed after HP processing (ASHIE; SIMPSON, 1996).

Several authors investigated the effect of HP on springiness, gumminess, chewiness, resilience, fracturability, and adhesiveness using Texture Profile Analysis (BRIONES-LABARCA et al., 2012; CHÉRET et al., 2005; PEREZ-WON; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; YAGIZ et al., 2007, 2009; YI; XU et al., 2013). However, there is no consistent data to support a clear effect of HP. It is possible that the effects are dependent on process parameters, fish species, and methodology used

There are few studies on texture of cooked fish ready for consumption, with no consistent information about the differences between raw and cooked fish. If on one hand the texture of raw fish influences consumers' decision at the time of purchase, texture of the cooked product is important due to the effects on sensory perception during consumption. There may be no direct relationship between these tests, since pressurized raw oysters exhibited increased toughness and springiness similar to the control, with lower values for these attributes after cooking (YI; XU et al., 2013). Probably, pressurization of a previously cooked or cured product cannot change texture parameters, since proteins have already been denatured, and thus, are not influenced by pressure (GUYON; MEYNIER; LAMBALLERIE, 2016).

3.6 Effects of HP on pH

HP treatments may promote a slight increase of pH (0.2 to 0.5 units). This phenomenon was observed in ground pork (CHEAH; LEDWARD, 1996), lean beef muscle (CARLEZ; VECIANA-NOGUES; CHEFTEL, 1995), cod (ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998), redfish, whiting, salmon, cod, and trout (SCHUBRING et al., 2003), oyster (CRUZ-ROMERO, M. et al., 2004; CRUZ-ROMERO, M.; KELLY; KERRY, 2007; CRUZ-ROMERO, M.; KERRY; KELLY, 2008), tuna (RAMIREZ-SUAREZ; MORRISSEY, 2006), red abalones (BRIONES-LABARCA et al., 2012), and shrimp (BINDU et al., 2013), subjected to 100-800 MPa.

However, other studies on pressurization of salmon (LAKSHMANAN; PARKINSON; PIGGOTT, 2007), oyster (CRUZ-ROMERO; KELLY; KERRY, 2007), shrimp (KAUR et al., 2013; YI; ZHANG et al., 2013), and sea bass (TEIXEIRA; FIDALGO et al., 2014) have shown no effect of HP on pH of the samples. In red mullet, a reduction in pH from 6.2-6.4 to 5.9 (ERKAN; ÜRETENER; ALPAS, 2010) was observed after pressurization. No changes in pH were observed in cod subjected to 400 and 600 MPa for 5 and 10 min, when compared to the control (6.50), while a pH reduction (6.28) was observed at 500 MPa / 10 min (MONTIEL et al., 2012). The pH of abalone was not affected at 100 MPa (6.31), but reduced (6.05) at 200

MPa, remained similar to the control at 300 MPa (6.35), and was higher than the control (6.45) at 400 MPa and 500 MPa (JO et al., 2014).

Different mechanisms have been suggested. Some authors have associated the increase in pH and protein denaturation (ANGSUPANICH; EDDE; LEDWARD, 1999; ANGSUPANICH; LEDWARD, 1998; MA; LEDWARD, 2004), which is more intense from 300 to 400 MPa, with partial or total denaturation of myofibrillar proteins and sarcoplasmic in most fish. It is possible that changes in the tertiary and quaternary structures expose alkaline amino acid radicals, such as imidazole of histidine, which ionize and alkalize the medium (FULLADOSA et al., 2009; RAMIREZ-SUAREZ; MORRISSEY, 2006). Similarly, it is possible that acid radicals are kept unavailable.

An increase in pH of beef can be observed during maturation, probably due to protein denaturation and release of alkaline amino acids resulting from the enzyme activity (RAWDKUEN; JAIMAKREU; BENJAKUL, 2013). Despite the covalent bond, cleavage is not expected due to HP processing, there may be changes in the free amino acid profile, possibly due to denaturation, leading to an increase in pH. Although this event was observed in cold smoked salmon subjected to HP, with changes in the free amino acid profile, it was nonspecific and unrelated to the process parameters (ERKAN et al., 2011). Despite the changes in the concentration of free alkaline and acidic amino acids, it was not possible to suggest the predominance of one or the other group as a function of the HP treatments.

HP processing can also lead to progressive dissociation of water molecules with increased pressure (10-100 times at 1000 MPa), reducing the pH from 0.2 to 0.5 units per 100 MPa (CHEFTEL; CULIOLI, 1997). The pH reduction phenomenon in pressurized water and other liquid foods (800 MPa) was observed by *in situ* measurements, however, it proved to be reversible after depressurization (SAMARANAYAKE; SASTRY, 2013). Nevertheless, a reduction in pH after HP process was observed in fruit juices (YU et al., 2013). Whereas the decrease in pH is related to the dissociation of water molecules, it is suggested that any mechanism leads to unavailability of OH⁻ (hydroxyl) ion during depressurization. Similarly, increasing pH in fish can be due to the unavailability of H₃O⁺ (hydrogen) ion, through specific interactions with the matrix components. In addition, the relative pH stability at pressures below 300-400 MPa can be due to lower dissociation of the water molecules, or buffering capacity of proteins (PACHECO-AGUILAR; LUGO-SÁNCHEZ; ROBLES-BURGUENO, 2000), which may be lost at higher pressures.

Further, the pH can also be affected by changes in dissociation constants of weak acids and bases in tissues. Acetic acid, phosphoric acid solutions, and distilled water may have pH reduction of 0.92, 0.40, and 0.31 units, respectively, at 200 MPa, while MES buffer can increase by 0.5 units (HAYERT; PERRIER-CORNET; GERVAIS, 1999).

It is also possible that the balance between formed and broken hydrogen bonds can affect pH. Evaluation *in situ* of pH of chicken broth subjected from 100 to 800 MPa showed pH reduction at 100 MPa, and further stability from 300 MPa (SAMARANAYAKE; SASTRY, 2013). The authors suggested that low pressure levels can contribute to the formation of new hydrogen bonds, which increase the movement of protons contributing to lowering pH. In contrast, pressures greater than 300 MPa can lead to breaking of these bonds, leading to a reduction in proton movement and buffering capacity of proteins, due to exposure of hydrophobic sites. Although these authors have reported that the pH changes were reversible upon depressurization, it is possible that changes in hydrogen bonding may

contribute to some degree to the increased pH in pressurized fish, which remained after depressurization through a still unknown phenomenon possibly related to the buffering capacity of proteins.

3.7 Effects of HP on Water Content

Fresh fish have water as a major component, with levels around 70%. The high water retention is due to electrostatic interactions and capillary forces. Considering that each gram of protein retains 0.5 g of water, and proteins represent 20%, it is expected that most of the water is held by capillary forces, maintaining intracellularity between the filaments and myofibrils, and extracellularity between fibers (LAKSHMANAN; PARKINSON; PIGGOTT, 2007).

One of the expected effects of HP is the increase in protein hydration. Treatment at 1000 MPa can promote an increase of 55% in the number of water molecules present in the hydration layer of proteins, although it can reduce by 7% the surface area (MESSENS; CAMP, VAN; HUYGHEBAERT, 1997; SILVA, J. L.; FOGUEL; ROYER, 2001). Further, the HP can lead to infiltration of water molecules in the protein core that is trapped spatially or through interactions with protein sites, since protein-water hydrogen bonds' length is shorter than the weakest noncovalent interactions between amino acids residues (MOZHAEV et al., 1996), which is favored by HP. Both mechanisms are supported by better packing of the water molecules (CHEFTEL; CULIOLI, 1997; LULLIEN-PELLERIN; BALNY, 2002; SILVA; FOGUEL; ROYER, 2001).

The higher sensitivity of the myosin head to HP affects the formation of an actomyosin complex, preventing sarcomere shortening and water loss by the compression of myofibrils and fibers. Moreover, the increased stability of myosin tail and actin contributes to maintaining the tissue integrity, favoring water retention. These events can explain the fact that cod subjected to 100 MPa presented lower water cooking loss when compared with the unpressurized control sample (HEDGES; GOODBAND, 2003).

Therefore, several authors have reported that the increase in moisture and / or water holding capacity of HP-treated samples is due to the potential of HP processing to increase the hydration capacity of proteins (BRIONES-LABARCA et al., 2012; CRUZ-ROMERO et al., 2004; CRUZ-ROMERO; KELLY; KERRY, 2007; CRUZ-ROMERO; KERRY; KELLY, 2008; KAUR et al., 2013; LAKSHMANAN; PARKINSON; PIGGOTT, 2007; SCHUBRING et al., 2003; YI; XU et al., 2013; YI; ZHANG et al., 2013; YOSHIOKA; YAMADA; MAKI, 1996).

However, considering that the process does not enable contact of the samples with water the increase in water content of the samples is not expected. There is no evidence that HP can increase the water mass of the sample, and the increase of the analytical result of moisture can be related to a greater efficiency of the analytical method in extracting the water. Thus, the results suggest that an increase in moisture can be indicative of lower water holding capacity.

The reduction of water holding capacity of the samples after HP processing can be due to compression of fibers (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; PEREZ-WON; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005) and protein denaturation (BOWKER; ZHUANG, 2015). The progressive decrease of water holding capacity is observed with

protein denaturation, especially myosin, which can start from 150 MPa (AUBOURG et al., 2013). This phenomenon was observed in sardine (WADA; OGAWA, 1996), sea bream (CAMPUS et al., 2010), red abalone (BRIONES-LABARCA et al., 2012), bay scallop (YI; XU et al., 2013), and abalone (JO et al., 2014). Other authors investigated HP treated tuna (RAMIREZ-SUAREZ; MORRISSEY, 2006), and found a slight decrease in moisture, while others studied bay scallop (PEREZ-WON; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005), salmon (ORTEA et al., 2010), and black tiger shrimp (JANTAKOSON; KIJROONGROJANA; BENJAKUL, 2012; KAUR et al., 2013), and found no effect of HP on moisture contents.

In the face of the antagonistic effects of increased hydration and reduction of water holding capacity, it is possible that both are dependent on the intensity of HP processing and species evaluated. HP-treated sea bass showed a slight increase in water holding capacity in treatments up to 300 MPa, with a progressive decrease of this parameter with increasing pressure (CHÉRET et al., 2005). Similarly, abalones presented water holding capacity similar to control up to 300 MPa / 3 min, with subsequent reduction (JO et al., 2014). It is possible that up to 300 MPa there is a predominance of hydrogen bonds between proteins and water (favoring water holding capacity), over the hydrogen bonds within and between proteins (disfavoring water holding capacity) (ZHANG et al., 2015). Thus, there is predominance of protein hydration and increase in water holding capacity in pressurizations below 300 MPa. However, since myofibrillar proteins denature from 200 to 300 MPa, and fiber compression can be observed from 300 MPa, it is possible that the decrease in water holding capacity prevails from 300 MPa. In fact, some studies on HP below 300 MPa (LAKSHMANAN; PARKINSON; PIGGOTT, 2007; SCHUBRING et al., 2003) evidenced an increase in water holding capacity. In contrast, pressures from 300 to 550 MPa (BRIONES-LABARCA et al., 2012; WADA; OGAWA, 1996) led to a reduction in water holding capacity.

3.8 Sensory Attributes

The possible effects of HP detected by instrumental methods are less noticeable during sensory evaluation. Few sensory studies assessed pressurized fish, but in general, the changes discretely influence the sensory attributes, most often positively (Table 4). Most research performing instrumental analyses do not include sensory evaluations by a trained panel, which would allow correlation with instrumental measurements. In addition, consumer studies aiming at investigating the effects of HP on consumers' attitude towards the use of HP on fish processing and product perception are recommended. Thus, care should be taken when interpreting the effects of HP detected by instrumental analysis as deleterious to the quality of pressurized fish.

Hurtado, Montero, & Borderías, (2000) evaluated pressurized hake and found slightly higher scores for overall appearance and odor, as a function of pressure levels. Despite higher flavor scores were observed when compared to the control (6.9), lower scores were observed within the pressure levels (from 8.2 to 200 MPa to 7.8 at 400 MPa). It is worth emphasizing that pressurization of the samples increased whiteness index (instrumental measurement), giving opaque appearance typical of cooked product. Considering that hake is a white fish, whitening may have contributed to its better appearance.

Schubring et al., (2003) compared conventional and pressurized thawing of redbfish, sea bass, salmon, cod, and trout, and evaluated the attributes texture, odor, color, flavor, and gaping in raw and cooked samples. In raw fish, higher scores were obtained for all attributes

Table 4 – HP researches on sensory properties of fish and seafood

Sea food	Pressure Treatments	Sample	Method	Main effects	Reference
<i>Fish</i>					
Cod	200 MPa (thawing)	Raw and cooked fillets (for 10 min in water at 80 °C, sealed in polyethylene film)	Panel of three trained judges in Quality Index Method (QIM) for analysis of odor, color, texture, gaping, taste.	In raw fillets, higher scores were obtained for color and texture in pressurized samples. In cooked samples, colors resulted in higher scores while pressurized, but lower scores were obtained for odor and taste in pressurized samples.	SCHUBRING et al., (2003)
	400, 500, and 600 MPa / 5 and 10 min	Smoked cod	The panel (five trained members in tasting) was asked to score visual appearance, odor quality, and smoked odor intensity of cod attributes using a 10 cm horizontal scale	No significant differences due to HP treatment or time of refrigerated storage were detected in appearance, quality of odor, and intensity of smoky odor.	MONTIEL et al., 2012
Hake	200 and 400 MPa / 5 min / 7 °C	Samples cooked in boiling water for 5 min	Panel of five semitrained tasters using a nonstructured scale running from 0 (poorest quality) to 10 (ideal) for analysis of general appearance, odor, and flavor	Immediately after pressurization, the pressurized samples exhibited general appearance and odor similar or slightly higher than control samples, and despite higher flavor scores were observed when compared to the control, the scores decreased as the pressure levels increased. During chilled storage, the pressurized samples scored higher than the control in all sensory parameters.	HURTADO et al., (2000)

Continues

Table 4 – Continuation

Rainbow trout	200 MPa (thawing)	Raw and cooked fillets for 10 min in water at 80 °C, sealed in PE film	Panel of three trained judges in QIM for analysis of texture, odor, color, gaping, taste.	Pressurization of the samples increased scores on texture in raw and cooked fillets. On the contrary, color was negatively influenced by HP in the raw and cooked samples. Pressurization of the samples increased scores at taste in cooked samples.	SCHUBRING et al., (2003)
Red mullet	220 and 330 MPa / 5 and / 3 and 25 °C	Raw fillets	In a panel of five experienced judges, fish fillets were assessed on the basis of appearance and odor characteristics using a 9-point descriptive scale	Samples pressurization did not affect appearance and odor immediately after treatment, although HP contributed to keeping the score above 4.0 (acceptability limit) longer during storage.	ERKAN et al., 2010
Redfish	200 MPa (thawing)	Raw and cooked fillets (for 10 min in water at 80 °C, sealed in PE film)	Panel of three trained judges in QIM for analysis of texture, odor, color, gaping, taste.	In raw fillets, higher scores were obtained for odor and texture in pressurized samples. In cooked samples, higher scores were obtained for color and lower scores were obtained for texture and taste in pressurized samples.	SCHUBRING at al., (2003)
Salmon	200 MPa (thawing)	Raw and cooked fillets (sealed in PE film for 10 min in water at 80 °C)	Panel of three trained judges in QIM for analysis of texture, odor, color, gaping, taste.	Samples pressurization increased scores on texture and gaping and decreased scores on color in raw fillets. In cooked samples texture, odor, color, and taste exhibited lower scores when pressurized.	SCHUBRING et al., (2003)

Continues

Table 4 – Continuation

Sea bass	250 and 400 MPa / 5 min / 6 °C	Raw sea bass fillets	In a panel consisting of at least six experienced judges, the intensity of odor, appearance, and texture (firmness) of fillets was assessed using a category scale, which ranged from 0 to 4	Color was lost in HP fillets (color whitening, similar to cooked fish). At 400 MPa, the brightness was intensified, and fillets became firmer. Fresh odor was not influenced by the pressure levels. Overall, the sensory acceptance of the HP products was high.	TEIXEIRA, MARQUES, et al., (2014)
Whiting	200 MPa (thawing)	Raw and cooked fillets (for 10 min in water at 80 °C, sealed in PE film)	Panel of three trained judges in QIM for analysis of texture, odor, color, gaping, taste.	In raw fillets, higher scores were obtained for color and texture in pressurized samples. In cooked samples, pressurization increased scores on odor and color and decreased scores at texture and taste.	SCHUBRING et al., (2003)

Molluscs

Bay scallop	200 MPa / 3 min and 350 MPa / 0 min	Fresh and cooked samples (in boiled water (100 °C) for 90 s, sealed in polyethylene bags)	Panel of 30 experienced panelists that used a 9-point hedonic scale to access various adductor muscle quality attributes.	In raw samples, attributes on integrality, color, hardness, springiness and odor exhibited similar or slight improvement scores when pressurized. In cooked samples, pressurization did not affect flavor, color, chewiness, and comprehensive impression.	YI et al., (2013)
-------------	-------------------------------------	---	---	--	-------------------

in the pressurized thawing, except color of trout and salmon. In contrast, in the cooked samples, the differences were less pronounced and more dependent on fish evaluated. Sea bass, salmon, and cod exhibited lower scores in most all attributes, while redfish and trout remained more similar between treatments.

Oysters subjected to 200 and 350 MPa exhibited similar or slight improvement in integrity, odor, color, hardness, springiness, and overall impression. When assessing the cooked samples after pressurization, the attributes like flavor, color, chewiness, and overall impression remained stable (ERKAN; ÜRETENER; ALPAS, 2010; YI; XU et al., 2013). Smoked cod was stable to HP processing, with no effects on appearance, odor quality, and smoked odor (MONTIEL et al., 2012). Those authors also observed no effect of HP on TBA index, which can explain the stability of odor quality, suggesting that whitening detected by instrumental analysis (L^* increased from 54.3 to 65.0) did not influence consumers' opinion.

Teixeira, Marques, et al., (2014) investigated pressurized sea bass, and observed loss of red color and increased whitening, similar to that found in the color instrumental analyses. In addition, the same panel observed an increase in firmness with increasing pressure levels. Fresh odor was not influenced by the pressure levels, although an increase in TBA values was observed.

HP processing has a significant effect on the elimination of microorganisms, inhibiting the production of biogenic amines, volatile nitrogen, and trimethylamine (MURCHIE et al., 2005b), which contribute to improved sensory quality and ensure the safety of fish. Thus, it can also contribute to the increase of shelf life of the products (AUBOURG et al., 2013; ERKAN; ÜRETENER; ALPAS, 2010; JO et al., 2014).

Further studies on consumer behavior in the face of possible effects caused by HP are needed. The negative and positive impacts of the changes in view of the consumers' opinion should be assessed as a role. Instrumental methods are extremely sensitive in detecting changes caused by the process, which are not always corroborated by panels or consumers.

Moreover, the possible positive effects of the changes, including hardening and whitening should be studied. Although benefits provided by HP can be appreciated by the consumers, they can be misunderstood by consumers and be taken as indicators of fish deterioration. Those factors may depend on the fish species since some may be less or more appreciated or neglected according to the consumer acceptance of the changes in the fish and its relation to the technology. In this sense, factors such as consumer knowledge about the process and perception of the benefits of HP processing, and the expected differences caused by pressure and cooking to fishes should be considered when interpreting the consumers' responses.

4 CONCLUSION

Although HP is considered an effective technology to preserve the properties of fresh food, in fish there is a threshold for intensity of treatment, with gradual changes according to the intensity of HP process. Changes in spatial conformation of protein, in protein oxidation and lipid oxidation, discoloration, in hardness, water holding capacity and in pH, are the effects most commonly seen in more intense HP treatments, with mechanisms demonstrating interdependence of processes. Protein changes, formation of free radicals, and metals catalysis seem to be the key events for the occurrence of these changes.

5 REFERENCES

References cited in this chapter and all other cited throughout the thesis are presented in a single session at the end of the thesis.

CAPÍTULO II

EFEITO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA SOBRE QUALIDADE FÍSICA E QUÍMICA DE FILÉ DE SARDINHA BRASILEIRA (*SARDINELLA BRASILIENSIS*)

RESUMO: sardinhas, um importante peixe capturado no Brasil e em todo o mundo, foi pressurizado a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 min ou 15 minutos e os resultados demonstraram que tempo de processo e nível de pressão influenciaram o **pH** (aumento de 0,41-0,46 unidades a 0 min e 0,48-0,55 a 15 min; sem efeito do nível de pressão), **força de cisalhamento** ($FC_{15min} > FC_{0min}$; $FC_{100MPa} = FC_{200MPa} < FC_{300MPa} < FC_{400MPa}$), **perda de líquido** (inferior ao controle em todos os níveis de pressão a 0 min e a 100 e 400 MPa a 15 min), e **índices de cor L^* , a^* , b^* , C^* , h^* e WI^*** (aumento progressivo dos índices com aumento do nível de pressão ou tempo de processo). A análise de componente principais ($PC1+PC2=78,82\%$ and $PC1+PC3=72,01\%$) sugere forte correlação entre L^* , WI^* , b^* , h^* , FC e pH, e agrupa o tratamento controle no mesmo cluster que os tratamentos de intensidade intermediária (300 and 400 MPa / 0 min and 200 and 300 MPa / 15 min). O agrupamento dos tratamentos de intensidade intermediária junto ao mesmo cluster do controle corrobora a hipótese de que a APH é uma tecnologia com potencial para preservar aspectos de frescor de sardinha.

Palavra chave: peixe, isostático, pH, cor, textura, perda de líquido.

ABSTRACT: Sardines, an important commercial fish both in Brazil and worldwide, were pressurized between 100-400 MPa/0 or 15 min and the results indicate that holding time and/or pressure levels influenced **pH** (increase of 0.41-0.46 at 0 min and 0.48-0.55 at 15 min), **shear force** ($SF_{15min} > SF_{0min}$; $SF_{100MPa} = SF_{200MPa} < SF_{300MPa} < SF_{400MPa}$), **drip loss** (lower than the control at all pressure levels at 0 min and at 100 and 400 MPa at 15 min), and **color indices** (progressive increase of the indices with increase of the pressure level or holding time). The Principal Component Analysis suggest a strong correlation between color indices, **SF** and **pH**, and grouped the control treatment in the same cluster as the intermediate intensity treatments (300 and 400 MPa/0 min and 200 and 300 MPa/15 min). This observation corroborates the hypothesis that HPP is a technology with the potential to preserve fish freshness parameters.

Keywords: fish; isostatic, texture, shear force, drip loss, pH.

1. INTRODUÇÃO

Alta Pressão Hidrostática (APH) é uma tecnologia não térmica capaz de conservar alimentos através da eliminação de microrganismos vegetativos e alteração de atividade enzimática, ao mesmo tempo em que exibe potencial de preservar propriedades nutricionais e sensoriais próximas às encontradas nos produtos frescos (KADAM et al., 2011). Recentes pesquisas têm investigado efeitos dessa tecnologia em diversas espécies de pescados como camarão (JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012; KAUR et al., 2013; BINDU et al., 2013; ZHANG et al., 2013), ostra (YI et al., 2013a), salmão (YAGIZ et al., 2009), carpa (SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006), truta (YAGIZ et al., 2007), arenque (FIGUEIREDO et al., 2015; KARIM et al., 2011), *robalo* (TEIXEIRA et al., 2014b), abalone (JO et al., 2014), *cavala* (TORRES et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2013; FERNANDES et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2015; REYES et al., 2015), bacalhau (MONTIEL et al., 2012). Os bons resultados encontrados fomentaram o desenvolvimento do processamento industrial de pescado por APH em diferentes partes do mundo (HUANG et al., 2017).

No entanto, a eficiência do processo mostra-se fortemente dependente da espécie processada (SCHUBRING et al., 2003; SCHUBRING, 2005; RODE e HOVDA, 2016) e da intensidade do tratamento. É possível que a faixa de 200 a 400 MPa possa ser crítico para maioria dos pescados, uma vez que nesse intervalo de pressão pode ocorrer desnaturação das principais proteínas (miofibrilares e sarcoplasmáticas) (ANGSUPANICH e LEDWARD, 1998; SCHUBRING et al., 2003; JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012) e o desencadeamento de oxidações de lipídios e proteínas (GUYON, MEYNIER e LAMBALLERIE, 2016; OLIVEIRA et al., 2017). De forma simultânea ou sequencial a esses eventos, pode ocorrer, ainda, alterações na cor, textura, pH e conteúdo de água (capacidade de retenção de água, umidade, *drip loss*) em níveis variáveis, de acordo com a intensidade do tratamento e espécie processada (MURCHIE et al., 2005b; KAUR et al., 2013; MEDINA-MEZA, BARNABA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; ZHANG et al., 2015).

Diante da especificidade da interação entre processo e espécie do pescado, torna-se necessário aprofundar as avaliações sobre efeito da APH na qualidade de carne de pescados de interesse comercial. São escassas pesquisas que avaliam a aplicação da APH em sardinha (TANAKA et al., 1991; WADA e OGAWA, 1996; GÓMEZ-ESTACA et al., 2007), apesar de ser um pescado que figura entre os mais capturados no mundo (FAO, 2014). No Brasil, a principal espécie é a *Sardinella brasiliensis*, que figura como o peixe marinho mais capturado no país (BRASIL, 2011; OCEANA INTERNACIONAL, 2015). Além da importância comercial, trata-se de um pescado que exibe composição de gordura benéfica para a saúde humana (elevado teor *polyunsaturated fatty acid* N-3 com elevada relação N-3 / N-6), podendo exibir potencial para combater doenças cardiovasculares, neurodevelopment disorders in infants, epilepsia, cancers, fat glycemc control e alzheimer (MURPHY et al., 2007; RIEDIGER et al., 2009; SCORZA et al., 2014).

Apesar da importância comercial e nutricional das sardinhas, seu processamento em escala industrial é mundialmente realizado empregando predominantemente tecnologias tradicionais, que exibem potencial para influenciar negativamente as características de frescor ou promover *shelf life* muito reduzido. A comercialização nas formas resfriada, congelada ou esterilizadas (elaboração de conservas) permite a ocorrência de efeitos indesejáveis, como oxidação lipídica, formação de óxido de colesterol e formação de amins biogênicas (TARLEY et al., 2004; SALDANHA, BENASSI e BRAGAGNOLO, 2008; ANDRADE et al., 2012; CARDENIA et al., 2013), além de promover vida útil muito reduzida (refrigeração) ou alterar drasticamente o aspecto de frescor (congelamento ou conservas). Isso se deve ao

fato de ser um peixe de elevada perecibilidade (pH próximo da neutralidade, elevada atividade de água, elevado teor de gordura, ácidos graxos insaturados e aminoácidos livres, e apresentar intensa atividade de enzimas autolíticas) susceptível à deterioração microbiológica, oxidativa e enzimática.

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa é avaliar o processamento inovador de aplicação de HPP em sardinhas. Para isso, foi avaliado aspectos de qualidade de filé de sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) submetida a pressurização de 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 or 15 min (tempo após atingida a pressão nominal). A avaliação da pressurização por “0 min” (pulso único com despressurização imediata após alcance do *set point*) é relevante por exibir potencial para contribuir para produtividade do processo industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção e Preparo das Amostras

Foram coletados 40 kg de amostra de sardinhas brasileira (*Sardinella brasiliensis*), frescas e refrigeradas, provenientes da costa oceânica de Angra dos Reis (Rio de Janeiro, Brasil – Latitude: 23° 00' 24" S e Longitude: 44° 19' 05" W), em fábrica de sardinha em conservas no município de São Gonçalo, RJ. Toda amostra foi transportada em caixas de isopor com gelo (proporção mínima de peixe e gelo de 1:2), posteriormente lavada em tanque de agitação com água e gelo (5 min) e preparadas (remoção manual de vísceras, escamas, cauda (corte na altura do orifício excretor), cabeça (corte na altura das brânquias) e espinhas) e pressurizadas no mesmo dia. Do total coletado, foram selecionadas 54 unidades (6 unidades por tratamento – 6 sardinhas x 9 tratamentos) apresentando peso individual entre 90 e 100 g com aspecto de frescor preservado (firmeza, coloração, integridade e aroma característicos).

2.2 Pressurização

Cada filé de sardinha foi individualmente embalado em saco plástico, selado a vácuo e submetido à pressurização em bateladas por 100 MPa, 200 MPa, 300 MPa ou 400 MPa, pelos tempos de 0 (zero) minutos (pulso único, despressurização imediata após alcance da pressão *set point*) ou 15 minutos (manutenção da pressão de *set point* constante por 15 minutos, seguida de despressurização). Foram pressurizadas seis amostras por tratamento (N=6) e filés de sardinhas não pressurizados foram utilizados como controle.

As pressurizações foram realizadas em equipamento Stansted Fluid Power modelo S-FL-850-9-W (Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, Brasil), que apresenta capacidade de pressurização entre 100 e 900 MPa e controle de temperatura entre 0 e 80 °C. Possui câmara de pressurização cilíndrica dotada de suporte em aço inox (Ø 4 cm, 30 cm de altura) para acondicionamento das amostras. Esse suporte possui perfurações em toda sua extensão para melhor circulação do fluido de pressurização (solução de álcool 70 %) e volume útil de 345 ml. A pressurização foi realizada por bomba hidráulica que desloca um pistão para o interior do cilindro, promovendo taxa de pressurização de 7 MPa.s⁻¹, sendo a despressurização praticamente instantânea após o alívio da pressão, ao final do ciclo (pressurização seguida de tempo de manutenção à pressão estabelecida de processo).

2.3 Análises

A Figura 1 apresenta o fluxo das análises realizadas. Anteriormente à pressurização, as sardinhas foram pesadas (peso fresco) e submetidas à medição de pH e cor. Imediatamente após a pressurização, as amostras foram avaliadas quanto à integridade de embalagem e preservação do vácuo, removidas das embalagens e pesadas (peso pressurizado) para cálculo

da Perda de Líquido. Posteriormente, por questões logísticas, foram reembaladas em sacos plásticos selados a vácuo e mantidas congeladas (- 18 °C) até realização das demais análises. Após descongelamento (12 horas a 4 °C), as sardinhas foram divididas em duas meias carcaças, sendo a da esquerda (vista frontal) submetida a análise de textura e a da direita a análises de pH e cor. Todas as análises foram realizadas com seis repetições (N=6) e as médias expressas através da média \pm desvio padrão. Amostras controle seguiram mesmos procedimentos, exceto a etapa de pressurização.

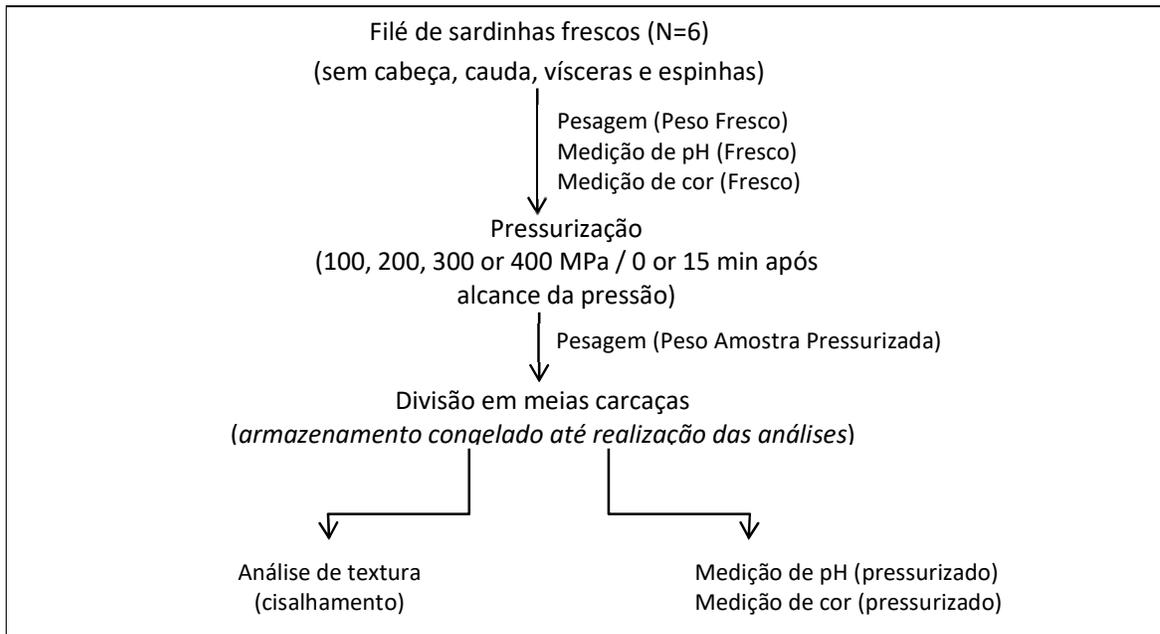


Figura 1 – Fluxo das amostras entre as análises.

2.3.1 pH

O pH das amostras foi mensurado através da inserção de um eletrodo de penetração acoplado a um pHmetro previamente calibrado. Foram analisados pH nas amostras antes e após a pressurização, na mesma região do mesmo músculo (Figura 2), de modo que o valor encontrado para o pH após a pressurização é referido como “pH_{APH}” e a diferença de pH antes e após a pressurização é referida como “ Δ pH”.

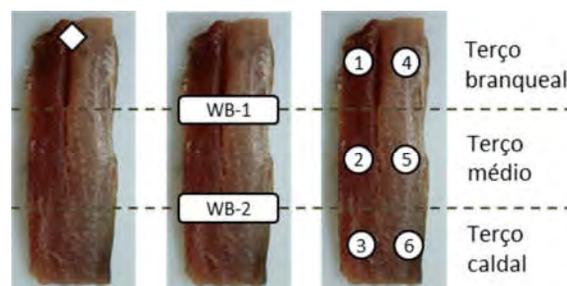


Figura 2 – Meia carcaça dos filés de sardinha com localização das análises de pH (◇), textura por método de cisalhamento (WB) e locais de leituras de cor (1 – 6).

2.3.2 Análise de cor

A superfície interna dos filés (porção cárnea, lado oposto à pele) foram avaliadas quanto a cor através de sistema de leitura CIElab em equipamento Chromameter CR-300 (Minolta Camera Co., Osaka, Japan) previamente calibrado, cujo iluminante foi o D65 e ângulo de observação foi 10°. A partir dos valores de L^* , a^* e b^* , foram determinados diferença global de cor ($\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$), índice de tonalidade ($h^* = \arctan(b/a)$), croma ($C = \sqrt{a^2 + b^2}$) e *Whitening Index* ($WI = 100 - \sqrt{((100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})}$). Foram realizadas seis leituras em cada filé nas posições ilustradas na Figura 2.

Todas as amostras foram avaliadas quanto ao índice de cor antes e após serem pressurizadas. Os índices de cor observados nas amostras pressurizadas foram referidos como índices absolutos (L^* , a^* , b^* , h^* , C^* , WI^* e ΔE^*). Já as diferenças entre esses valores e os observados nas mesmas amostras, antes da pressurização, foram referidas como diferença de cor (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , Δh^* , ΔC^* , ΔWI^* e $\Delta \Delta E^*$). Os valores absolutos de ΔE^* foram calculados pela diferença entre as amostras pressurizadas e o controle ($\Delta L^* = L^*_{\text{Amostra Pressurizada}} - L^*_{\text{Amostra Controle}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{Amostra Pressurizada}} - a^*_{\text{Amostra Controle}}$...) e os valores de $\Delta \Delta E^*$ calculados à partir da diferença entre amostras pressurizadas e antes de pressurizar ($\Delta L^* = L^*_{\text{Pressurizado}} - L^*_{\text{Antes da Pressurização}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{Pressurizado}} - a^*_{\text{Antes da Pressurização}}$...).

2.3.3 Análise de textura

Força de cisalhamento (FC) foi determinada utilizando texturômetro *TA-HDi* (Texture Technologies Corp./ Stable Micro Systems, UK) através do cisalhamento das meias carcaças direita dos filés pressurizados posicionadas com a porção muscular voltada para a probe (pele voltada o suporte do equipamento) de maneira a serem analisadas nas posições apresentadas na Figura 2 (duas leituras por amostra). O equipamento foi previamente calibrado com célula de 50 kg, com probe Warner Bratzler de 1,00 mm de espessura programada com velocidade de aproximação e retorno de 4 mm.s⁻¹, e corte a 2 mm.s⁻¹. A FC foi determinada pelo pico de força máxima (g) obtida na curva de deformação.

2.3.4 Perda de peso

A perda de peso causada pela pressurização foi calculada através das diferenças de peso antes e após a pressurização. Todas as pesagens foram precedidas da remoção de líquido das embalagens e posterior suave compressão de uma folha de papel absorvente para remoção de líquido livre nas superfícies das amostras.

2.4 Estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) considerando arranjo Fatorial 4 x 2 + 1 (4 níveis de pressão x 2 níveis de tempo + parcela adicional – controle) através do pacote estatístico ExpDes.pt do programa R version 3.3.1. Teste de Dunnet (controle como testemunha) foi aplicado sempre que a interação Tratamento Adicional*Fatorial foi significativa. O efeito do tempo de processo, nível de pressão ou a interação (tempo vs pressão), foram avaliados através do teste de Tukey. Os dados ainda foram tratados através de Análise de componentes principais (ACP) e formação de clusters (weighted average linkage, euclidean distance and automatic truncament (MARSZALEK; MITEK; SKAΨSKA, 2015) utilizando software XLSTAT (2017). Adotou-se $\alpha = 5\%$ em todas as avaliações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 pH

Os filés de sardinha frescos apresentaram pH médio de $6,39 \pm 0,08$ antes da pressurização (*data not shown*), valores considerados normais, uma vez que pescados frescos podem comumente apresentar pH entre 6,3 e 7,0 (GONÇALVES, 2011). A guarda das amostras em condição de congelamento resultou em aumento do pH em $0,38 \pm 0,04$ (Tabela 1), evento que se deve, possivelmente, à liberação de compostos nitrogenados não proteicos alcalinos por atividade enzimática (CHAIJAN et al., 2005; KARAYANNAKIDIS et al., 2008).

Tabela 1 – pH de filés de sardinha brasileira pressurizada (pH_{APH}) e variação do pH com a pressurização (ΔpH) por 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 min ou 15 min.

Controle	pH		ΔpH	
	$6,81 \pm 0,05^{(1)}$		$0,38 \pm 0,04^{(2)}$	
Amostras Pressurizadas	pH_{APH}		ΔpH	
Níveis de Pressão	0 min	15 min	0 min [#]	15 min [#]
100 MPa	$6,85 \pm 0,05$	$6,90 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,08$	$(^{>})0,48 \pm 0,04$
200 MPa	$6,81 \pm 0,07$	$6,85 \pm 0,06$	$0,41 \pm 0,03$	$(^{>})0,48 \pm 0,02$
300 MPa	$6,84 \pm 0,16$	$6,92 \pm 0,08$	$0,46 \pm 0,07$	$(^{>})0,55 \pm 0,05$
400 MPa	$6,82 \pm 0,02$	$6,86 \pm 0,10$	$0,42 \pm 0,02$	$(^{>})0,53 \pm 0,05$

⁽¹⁾ pH controle após guarda das amostras congeladas para realização das análises (não pressurizado);

⁽²⁾ Variação de pH do controle exclusivamente pela guarda congelada para posterior realização das análises (não pressurizado);

^(>) Médias seguida de ^(>) exibe media maior que o controle ($p=0,014$).

Efeito significativo do tempo de processo (0 min e 15 min) ($p \leq 0,001$);

Não houve efeito significativo da APH sobre o pH_{APH} (Tabela 1). Não houve efeito do tempo de processo ($p=0,305$) e do nível de pressão ($p=0,584$), bem como não houve diferença significativa ($p=0,115$) entre o controle e quaisquer dos tratamentos pressurizados. Esses resultados estão de acordo com o observado em salmão pressurizado a 100 – 200 MPa / 10 – 20 min (LAKSHMANAN et al. 2007), camarão a 550 MPa / 5 min (YI et al., 2013b), ostra pressurizada a 260 MPa / 3 min (CRUZ-ROMERO, KELLY e KERRY, 2007), e atum pressurizado a 150 – 220 MPa / 15 – 30 min / 20 °C (KAUR et al., 2013). No entanto, a APH influenciou o ΔpH (diferença de pH na mesma amostra antes e após pressurização), de maneira que os processos mais longos por 15 min, causaram aumento de ΔpH superior ao controle ($p=0,014$) e superior ao observado nas amostras pressurizadas por 0 min ($p \leq 0,001$) independente do nível de pressão (Tabela 1). Esse resultado está de acordo com encontrado em diversos outros pescados (SCHUBRING et al., 2003; CRUZ-ROMERO et al., 2004; RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006; CRUZ-ROMERO, KELLY e KERRY, 2007; CRUZ-ROMERO, KERRY e KELLY, 2008; HSU et al., 2010; BRIONES-LABARCA et al., 2012; BINDU et al., 2013), ainda que, de maneira geral, ocorram em valores nominalmente muito pequenos, inferiores a 0,5 unidade.

A diferença entre os resultado encontrados pelas duas técnicas utilizadas (ausência de efeito sobre o pH_{APH} e efeito significativo do tempo de processo para o ΔpH) sugere que a

avaliação do ΔpH pode ter exibido maior sensibilidade e estabilidade frente à eventuais interferentes da análise. Variações naturais entre os indivíduos (amostras), entre os músculos e/ou entre partes do músculo analisado podem influenciar os resultados da avaliação do pH_{APH} , tornando o efeito da APH mais difícil de ser detectado, principalmente diante de variações esperadas tão reduzidas.

Ainda que não haja consenso sobre a atuação individual ou em conjunto de diferentes mecanismos que possam contribuir para o aumento do pH, a desnaturação das proteínas pode contribuir por disponibilizar radicais alcalinos antes voltados para o interior das proteínas, que se ionizam alcalinizando o meio e/ou, analogamente, vertendo para o interior das proteínas radicais dos aminoácidos ácidos antes ionizados (ANGSUPANICH e LEDWARD, 1998; KO, JAO e HSU, 2003; MA e LEDWARD, 2004; FULLADOSA et al., 2009). De fato, a APH pode alterar o perfil de aminoácidos na superfície de proteínas, conforme observado através do aumento da hidrofobicidade da superfície (ZHANG et al., 2015). Adicionalmente, é possível haver alteração no perfil de aminoácidos livres (ERKAN et al., 2011), com eventual aumento da concentração de aminoácidos alcalinos livres, por ocasião da desnaturação das proteínas causada pela APH.

Alterações no pH durante o processamento por APH (medição *in situ*) foram atribuídas às alteração das constantes de dissociação de ácidos e bases fracas e da molécula de água (HAYERT, PERRIER-CORNET e GERVAIS, 1999; STIPPL, DELGADO e BECKER, 2005). É possível que a dissociação da molécula da água cause redução do pH entre 0,2 e 0,5, ainda que reversível após a despressurização (CHEFTEL e CULIOLI, 1997). De maneira similar, ainda em medição *in situ*, o pH de caldo de frango exibiu progressiva redução até 500 MPa e discreto aumento entre 500 MPa e 800 MPa, mas foram, da mesma forma, reversíveis após a despressurização (SAMARANAYAKE e SASTRY, 2013). Por outro lado, o abaixamento de pH observado em suco de frutas é preservado após a despressurização (YU et al., 2013). Dessa forma, é possível que fenômenos relacionados à pressurização e à despressurização, e sua interação com propriedades intrínsecas das matrizes, possam influenciar no efeito da APH sobre o pH.

3.2 Índices de Cor

O aspecto visual dos filés (Figura 3) demonstra perda do brilho avermelhado e aumento do esbranquiçamento e da opacidade com o aumento progressivo da intensidade da APH, conferindo aspecto visual similar ao de cozimento. Esse fenômeno vem sendo observado em pescados pressurizados a partir de 200-300 MPa e relacionado à desnaturação e coagulação de proteínas (YAGIZ et al., 2007; CRUZ-ROMERO, KERRY e KELLY, 2008; JANTAKOSON, KIJOONGROJANA e BENJAKUL, 2012; KAUR et al., 2013).

Os resultados dos índices absolutos de cor (leitura direta nas amostras pressurizadas) são apresentados na Figura 4. Em relação ao controle, tratamentos superiores a 300 MPa / 0 min e 200 MPa / 15 min promoveram aumento dos valores de L^* ($p \leq 0,001$) e WI^* ($p \leq 0,001$), e pontualmente 200 MPa / 15 min e 400 MPa / 0 promoveram redução de a^* ($p = 0,037$). Os índices b^* ($p = 0,942$), C^* ($p = 0,520$) e h^* ($p = 0,922$) do controle não diferiram das amostras pressurizadas em quaisquer dos tratamentos. O aumento do nível de pressão causou aumento de todos os índices de cor e, de maneira geral, mais intensamente quando aplicado por 15 min. De forma similar, o aumento do tempo de processo causou aumento dos índices de cor de maneira mais frequente a partir de 200 MPa. Os índices menos influenciados pela intensidade das pressurizações foram a^* e C^* .

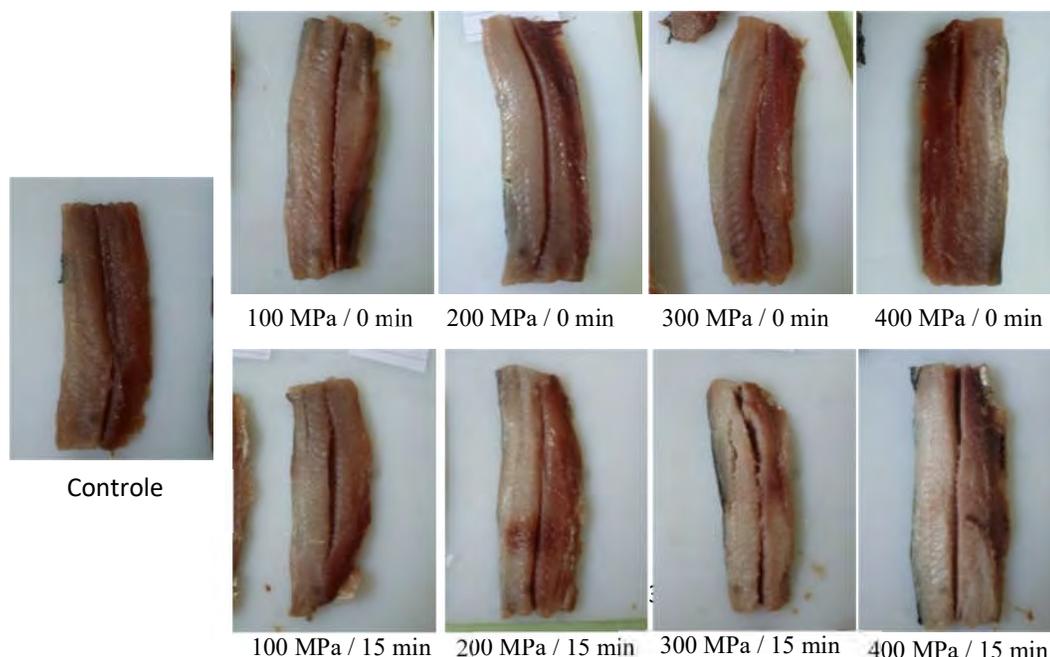
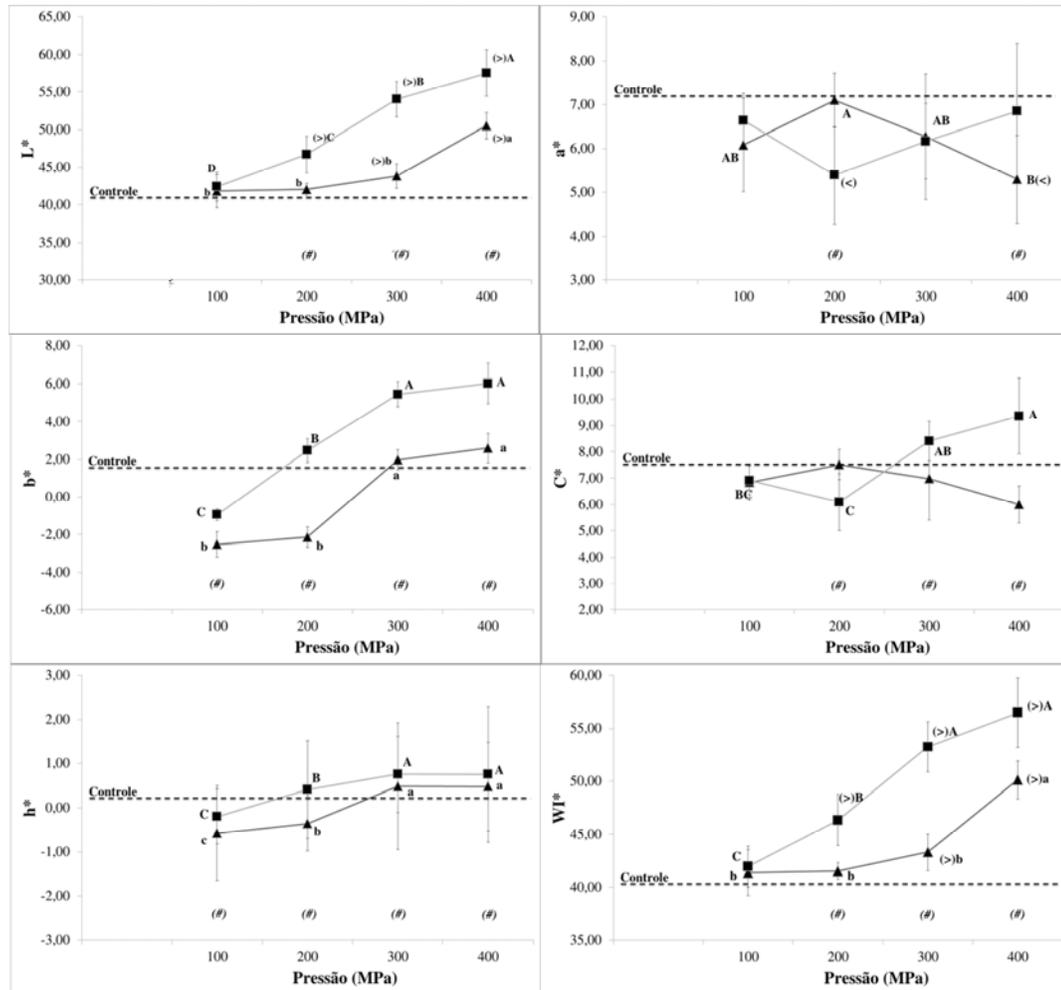


Figura 3 – Aspecto visual dos filés de sardinhas controle e pressurizadas a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 min ou 15 min.

De acordo com HunterLab (1996), as avaliações de cor devem ser expressas, pela variação dos índices de cor em relação a algum padrão, que podem ser a(s) cerâmica(s) de calibração (utilizada nessa pesquisa para medição dos índices absolutos de cor), o tratamento controle (SCHUBRING, 2005; CRUZ-ROMERO, KELLY e KERRY, 2007) ou a própria amostra previamente à pressurização (BAK et al., 2013). Nessa pesquisa, os resultados encontrados para a avaliação do índice absoluto de cor (Figura 4) e a avaliação da variação dos índices de cor (medição na mesma amostra antes e após pressurização) (Tabela 2) exibiram resultados similares. De maneira geral, a segunda metodologia tende a não detectar efeito dos níveis de pressão e tempo em amostras pressurizadas a 100 e 200 MPa.

Os valores de ΔE^* calculados a partir dos índices absolutos de cor (controle como referência) sugerem que a APH promoveu variações globais de cor (*dados não apresentados*) entre 3,05 – 4,37 (tratamentos mais brandos – 100, 200 e 300 MPa / 0 min e 100 MPa / 15 min) até 17,30 (tratamento mais intenso – 400 MPa / 15 min). Já os valores de $\Delta\Delta E^*$ (própria amostra antes da pressurização como referência) exibiram comportamento similar ao ΔE^* , porém, com valores absolutos superiores (Tabela 2). De acordo com escala proposta por Adekunle et al. (2010), ($\Delta E^* < 1,5$: diferença pouco distinta; $1,5 < \Delta E^* < 3,0$: diferença distinta; e $\Delta E^* > 3,0$: diferença muito distinta), os índices ΔE^* e $\Delta\Delta E^*$ sugerem, de forma similar, que a APH causa alterações igualmente “muito distintas” nas amostras. No entanto, se avaliadas as alterações através de outra escala de sete níveis, conforme utilizada por Cruz-Romero, Kelly e Kerry (2007) (0 a 0,2: diferença de cor imperceptível; 0,2 a 0,5: muito pequena diferença; 0,5 a 1,5: pequena diferença; 1,5 a 3,0: diferença detectável; 3,0 a 6,0: diferença muito detectável; 6,0 a 12,0: diferença ainda mais detectável; e >12 diferença muito fortemente detectável), o índice $\Delta\Delta E^*$ expressa efeitos mais intensos da APH que o índice ΔE^* , principalmente, nos tratamentos de maior intensidade.



¹ Valores obtidos a partir da leitura direta dos índices de cor nas amostras pressurizadas;

(>)(<) Indica média superior (>) ou inferior (<) ao controle;

A,B,C,D Indicam diferenças entre os níveis de pressão dos tratamentos a 15 min;

a,b,c,d Indicam diferenças entre os níveis de pressão dos tratamentos a 0 min;

(#) Indica efeito significativo do tempo dentro do mesmo nível de pressão;

Figura 4 – Índices absolutos de cor¹ de carne de filé de sardinha controle (---) e pressurizada a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 (▲) ou 15 min (■)

Os mecanismos nos quais a cor é alterada pela APH ainda não estão bem esclarecidos, mas há evidências de que estejam relacionados à desnaturação proteica, oxidação do pigmento, de lipídeos e/ou de proteínas, e que o ferro (heme ou livre) atue como catalisador de todos esses processos.

Algumas pesquisas demonstram que os índices cor em carnes e pescados se modificam até limite de APH a partir do qual se mantém constante (CRUZ-ROMERO, KERRY e KELLY, 2008; JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012; BAK et al., 2013; KAUR et al., 2013). Esse comportamento pode sugerir que essas alterações evoluem de acordo com a progressão da desnaturação das proteínas. Na presente pesquisa WI* e C* (15 min), e b* e h* (0 or 15 min) exibiram progressiva alteração até 300 MPa, intensidade além da qual mantiveram-se constantes. Já L* exibiu aumento progressivo até o tratamento mais intenso avaliado (400 MPa). Considerando que as principais proteínas miofibrilares podem se

Tabela 2 - Variação¹ dos índices de cor de filé de sardinha brasileira pressurizados a 100, 200, 300 ou 400 MPa por 0 ou 15 min.

Nível de Pressão	Tempo de processo	Color Index						
		ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔC^*	Δh^*	ΔWI^*	$\Delta \Delta E^*$
100 MPa	0 min	7,32 ± 1,94 ^b	-6,42 ± 0,81	(#) -3,56 ± 1,24 ^b	-4,88 ± 1,49	-0,25 ± 0,16 ^b	7,62 ± 1,16 ^b	8,17 ± 0,93 ^b
200 MPa	0 min	6,04 ± 1,01 ^b	-4,36 ± 0,56	(#) -2,66 ± 0,47 ^b	-5,20 ± 1,06	(#) -0,29 ± 0,03 ^b	6,35 ± 2,62 ^b	(#) 7,51 ± 1,34 ^b
300 MPa	0 min	(#) 6,54 ± 1,15 ^b	-4,83 ± 1,98	(#) 2,63 ± 1,33 ^a	(#) -3,97 ± 2,01	(#) 0,43 ± 0,09 ^a	(#) 8,07 ± 4,61 ^b	(#) 8,44 ± 2,38 ^b
400 MPa	0 min	(#) 12,89 ± 2,64 ^a	(#) -5,14 ± 1,79	(#) 3,82 ± 0,65 ^a	(#) -4,34 ± 1,66	0,69 ± 0,25 ^a	(#) 16,47 ± 3,18 ^a	(#) 14,15 ± 2,69 ^a
100 MPa	15 min	4,69 ± 1,65 ^C	-4,86 ± 1,59 ^{AB}	(#) 0,41 ± 1,28 ^D	-4,81 ± 0,64 ^B	-0,38 ± 0,25 ^C	5,31 ± 0,71 ^B	6,50 ± 2,24 ^B
200 MPa	15 min	9,25 ± 1,53 ^C	-5,30 ± 2,00 ^{AB}	(#) 3,21 ± 1,32 ^C	-4,21 ± 1,25 ^B	(#) 0,33 ± 0,08 ^B	8,67 ± 3,41 ^B	(#) 11,25 ± 2,01 ^B
300 MPa	15 min	(#) 19,00 ± 4,30 ^B	-5,67 ± 1,76 ^B	(#) 5,68 ± 1,02 ^B	(#) -1,02 ± 1,94 ^A	(#) 0,83 ± 0,10 ^A	(#) 19,03 ± 1,86 ^A	(#) 20,62 ± 4,65 ^A
400 MPa	15 min	(#) 23,79 ± 1,95 ^A	(#) -3,48 ± 1,19 ^A	(#) 7,10 ± 1,20 ^A	(#) 0,58 ± 3,10 ^A	0,82 ± 0,18 ^A	(#) 20,69 ± 2,94 ^A	(#) 25,24 ± 2,33 ^A

¹ Diferença dos índices de cor antes e após a pressurização

A,B,C,D Indicam diferenças entre os níveis de pressão dos tratamentos a 15 min;

a,b,c,d Indicam diferenças entre os níveis de pressão dos tratamentos a 0 min;

(#) Indica efeito significativo do tempo dentro do mesmo nível de pressão;

até 400 MPa (ANGSUPANICH e LEDWARD, 1998; JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012; SCHUBRING et al., 2003), é possível que a estabilidade dos índices observada a partir de 300 MPa esteja relacionada à conclusão da desnaturação das proteínas miofibrilares, e variações de L^* esteja mais fortemente dependentes da desnaturação de proteínas sarcoplasmáticas.

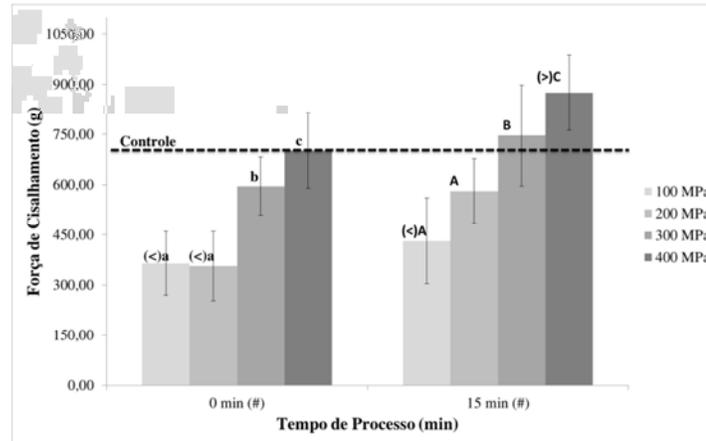
Outro fator que pode influenciar a cor das sardinhas pressurizadas são processos oxidativos que podem ser desencadeados pela APH. É possível que a APH cause redução na concentração de mioglobina (vermelho púrpura) ou oximioglobina (vermelho brilhante) e aumento da concentração de metamioglobina (vermelho amarronzado) em pescados e carnes pressurizadas (CHEAH e LEDWARD, 1996; CARLEZ, VECIANA-NOGUES e CHEFTEL, 1995). Apesar de não ser esperado que a APH cause diretamente a oxidação do Fe ($2+$ na mioglobina e oximioglobina para $3+$ na metamioglobina), é possível que outros processos influenciem essa oxidação. Pescados pressurizados a partir de 150 – 300 MPa podem exibir oxidação de proteínas (KO, JAO e HSU, 2003; HSU et al., 2007; ZHOU et al., 2014) e de lipídeos (YAGIZ et al., 2007; BINDU et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014b) e, considerando que essas oxidações exibem mecanismos semelhantes à oxidação dos pigmentos e que produzem intermediários reativos capazes de catalisar o processo de origem e os demais (FAUSTMAN et al., 2010; GUYON, MEYNIER e LAMBALLERIE, 2016), é possível que alterações de cor se devam em decorrência das oxidações em geral. Sardinhas pressurizadas podem exibir oxidação lipídica (180 MPa / 0, 30 ou 60 min) em extensão proporcional ao tempo de processo (TANAKA et al., 1991), e podem exibir estreita relação entre essa oxidação e o conteúdo de mioglobina (WADA e OGAWA, 1996).

Adicionalmente, é possível que a APH promova liberação de ferro livre no meio ou cause alteração na estrutura do pigmento deixando-o mais exposto e, conseqüentemente, mais reativo para participar como catalisador de oxidação. O papel do ferro em oxidações causadas pela APH é evidenciado em experimentos que demonstram a efetividade de complexantes metálicos, como o EDTA, em prevenir esses processos (HUANG, et al., 2012; BOLUMAR, ANDERSEN e ORLIEN, 2014).

3.3 Força de Cisalhamento

Visualmente, observou-se que as mostras pressurizadas em tratamentos superiores a 300 MPa / 0 min e 200 MPa / 15 min exibiram perceptível adesão entre os músculos que mantiveram contato durante a pressurização, o que pode sugerir potencialização das propriedades ligantes e/ou geleificação das proteínas. Esse mesmo evento foi observado em carne bovina moída pressurizada (até 150 MPa) e atribuído aumento da *tensile strength* à maior coesão das partículas (MACFARLANE et al., 1984), o que pode ter ocorrido devido a geleificação das proteínas causada pela APH (CHEFTEL e CULIOLI, 1997). O aumento da intensidade da pressurização pode induzir a formação de interações intra ou entre proteínas (pontes dissulfetos e interações hidrofóbicas) conferindo propriedade de gel ao meio (KO; JAO; HSU, 2003; HSU et al., 2007; ZHOU et al., 2014).

Os resultados da força de cisalhamento (FC) dos filés de sardinhas são apresentados na Figura 5. A pressurização influenciou a FC das amostras ($p=0,024$) de maneira que as pressurizadas exibiram menor FC que o controle quando submetidas aos tratamentos mais brandos (100 MPa / 0 ou 15 min e 200 MPa / 0 min) e FC superior ao controle quando submetidas ao tratamento mais drástico (400 MPa / 15 min). Os níveis de tempo de processo ($p\leq 0,001$) e níveis de pressão ($p\leq 0,001$) causaram aumento da FC de maneira independente, de forma que $FC_{0\text{min}} < FC_{15\text{min}}$ e $FC_{100\text{MPa}} = FC_{200\text{MPa}} < FC_{300\text{MPa}} < FC_{400\text{MPa}}$.



(>)(<) Indica média superior (>) ou inferior (<) ao controle;

A,B,C,D Indicam diferenças entre os níveis de pressão dos tratamentos a 15 min;

a,b,c,d Indicam diferenças entre os níveis de pressão dos tratamentos a 0 min;

(#) Indica efeito significativo do tempo dentro do mesmo nível de pressão;

Figura 5 – Força de cisalhamento (g) de filé de sardinha controle ou pressurizadas por 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min.

O aumento da dureza com aumento dos níveis de pressão foram observados em salmão pressurizado a 100, 300 MPa / 0 – 60 min (AMANATIDOU, 2000) e 100 - 300 MPa / 10 - 30 min / 20 - 30 °C (LAKSHMANAN, MISKIN e PIGGOTT, 2005) e bacalhau defumado pressurizado a 400-600 MPa / 5-10 min (MONTIEL et al., 2012). Já a FC em ostras pressurizadas foi maior que o controle, mas não foi influenciada pela intensidade (260, 400 and 600 MPa / 5min) do tratamento (CRUZ-ROMERO, KERRY e KELLY, 2008). Polvo pressurizado (200 a 400 MPa / 15 min / 7 e 14 °C) exibiu FC a 200 MPa e 300 MPa superior ao controle e a 400 MPa (HURTADO et al., 2001). Salmão defumado não exibiu efeito da APH para dureza (400-900 MPa/ 20 s), o que foi atribuído à baixa umidade do produto (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010).

A APH pode causar distintos efeitos na matriz cárnea promovendo amaciamento ou endurecimento, de acordo com a intensidade e a espécie pressurizada. A redução da dureza em robalo pressurizada entre 100 e 300 MPa / 5 min ocorreu simultaneamente ao aumento da capacidade de retenção de água, e a recuperação da dureza para níveis similares ao do controle (400 e 500 MPa / 5 min) ocorreu simultaneamente à redução da capacidade de retenção de água e a progressiva compactação das fibras (CHÉRET et al., 2005). A compactação das fibras musculares e modificações de tecido conjuntivos associados pode ser observada como efeito da HPP em outras pesquisas (HURTADO et al., 2001; PEREZ-WON,

TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; BRIONES-LABARCA et al., 2012).

Camarão exibiu força de cisalhamento similar ao controle a 200 MPa e superior a partir de 400 MPa; e força de compressão similar ao controle a 200 e 400 MPa e superior a partir de 600 MPa. Em ambas as metodologias foi demonstrado progressivo aumento dos índices com o aumento do nível de pressão entre 200 e 800 MPa / 20 min (JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012). Os autores relacionaram esse comportamento à progressiva desnaturação de proteínas com formação de agregados compactos.

Outro fator que pode estar relacionado à redução da FC é a desintegração da estrutura miofibrilar, que também pode ocorrer em reduzidos níveis de APH (SUZUKI, WATANABE e IWAMURA, 1990).

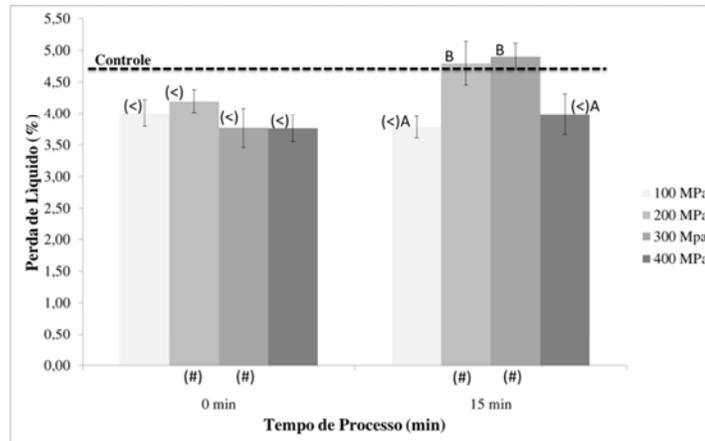
É possível que os efeitos da APH sobre capacidade de retenção de água, compactação do tecido, formação de agregados compactos proteicos e a desintegração da estrutura miofibrilar ocorra em intensidade variável com nível de pressurização e espécie avaliada. A presente pesquisa demonstrou que baixos níveis de APH podem causar a redução da FC e o aumento gradativo da intensidade do tratamento contribui para o aumento progressivo da FC. Considerando que o amaciamento de pescados é usualmente indicador de deterioração, o aumento da FC pode eventualmente ser um resultado positivo para qualidade da carne. No entanto, não há consistência de informação sobre essa hipótese e estudos com consumidores são necessários para elucidar essa questão.

Por fim, há grande diversidade de metodologias utilizadas para determinação de textura em pescados. As pesquisas referenciadas nesse artigo realizaram as análises com diferentes técnicas em diversos equipamentos com distintos parâmetros de teste. Não se observou padronização na metodologia para esse tipo de avaliação, o que pode tornar cada pesquisa muito específica em relação às condições de análise realizada.

3.4 Perda de Líquido

Os resultados da perda de líquido (DL) são apresentados na Figura 6. A exceção dos tratamentos a 200 e 300 MPa / 15 min, os demais promoveram redução da perda de líquido em relação ao controle ($p \leq 0,001$) e foram similares entre si. A aplicação de pressão por 0 min causa mesma ($p=0,081$) redução da perda de líquido, independente do nível de pressão utilizado. Já a 15 min, a aplicação de 100 ou 400 MPa proporcionam perda de líquido inferiores ($p \leq 0,001$) aos observados a 200 e 300 MPa. O tempo de processo influencia a perda de líquido apenas a 200 MPa ($p=0,003$) e 300 MPa ($p \leq 0,001$) quando o aumento de 0 para 15 min causou aumento até níveis similares ao controle.

A perda de líquido causado pela APH pode ser influenciada pela espécie avaliada e pela intensidade do tratamento. O descongelamento assistido sob pressão (200 MPa) causou diminuição em redfish, haddock e badejo, mas não exibiu efeito em salmão e truta, e promoveram aumento em bacalhau (SCHUBRING et al., 2003). Já robalo exibiu tendência a redução do drip loss quando pressurizada até 300 MPa / 5 min, com progressivo aumento a 400 e 500 MPa / 5 min (CHÉRET et al., 2005).



(^{(<i>C</i>}) Indica média inferior (^{(<i>C</i>}) ao controle;

A,B,C,D Indicam diferenças entre os níveis de pressão dos tratamentos a 15 min;

(^{(<i>#</i>}) Indica efeito significativo do tempo dentro do mesmo nível de pressão;

Figura 6 – Perda de Líquido (%) da carne de filé de sardinha não pressurizada (controle) ou pressurizada a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min.

Em nível molecular, a APH pode aumentar a retenção de água por promover o aumento da hidratação das proteínas através do melhor empacotamento e inserção de moléculas de água no cerne proteico, ou por promover a geleificação das proteínas reduzindo a mobilidade das moléculas e prevenindo a exsudação (MOZHAEV et al., 1996; CHEFTEL e CULIOLI, 1997; MESSENS, CAMP-VAN e HUYGHEBAERT, 1997; SILVA, FOGUEL e ROYER, 2001; LULLIEN-PELLERIN e BALNY, 2002). Tratamentos de APH de baixa intensidade tendem a favorecer a formação de ligações de hidrogênio proteínas-água em detrimento a ligações de hidrogênio entre/intra proteínas, o que também contribui para o aumento da WHC (ZHANG et al., 2015). Por outro lado, a APH pode promover redução da capacidade de retenção de água através da desnaturação das proteínas, o que contribui para compactação das mesmas e redução de superfície para interação água-proteína, liberando água antes aprisionada eletrostaticamente (BOWKER e ZHUANG, 2015). Por fim, a APH pode o favorecer a liberação de água antes aprisionada por forças capilares através da compactação das fibras e fragmentação de estruturas miofibrilares (SUZUKI, WATANABE e IWAMURA, 1990; ASHIE e SIMPSON, 1996; PEREZ-WON, TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010).

De maneira geral, é possível que a APH não exerça efeito ou contribua discretamente para aumento da retenção de líquido em tratamentos brandos, de até 300 MPa, ou de baixo tempo de processo. Carne de robalo pressurizado exibiu discreta redução na perda de líquido por exsudação (diferença de peso antes e após pressurização) e aumento da capacidade de retenção de água (perda de peso por centrifugação) até 300 MPa / 5 min, intensidade além da qual a perda por exsudação aumentou discretamente e a capacidade de retenção de água reduziu intensamente (CHÉRET et al., 2005). De forma similar, abalone apresentou capacidade de retenção de água similar ao controle entre 100 e 300 MPa / 3 min e inferior ao controle a 400 ou 500 MPa / 3 min (JO et al., 2014).

Dessa forma, é possível que em tratamentos de baixa intensidade haja predominância dos efeitos de hidratação da proteína e, logo, redução da perda de líquido. Já o gradativo aumento da intensidade da APH pode provocar desnaturação de proteínas miofibrilares e

compressão de fibras e progressiva fragmentação da miofibrila, contribuindo para aumento progressivo da perda de líquido.

Na presente pesquisa, é possível que nos tratamentos 100 a 400 MPa / 0 min e 100 MPa / 15 min tenha proporcionado predominância da hidratação das proteínas, o que justificaria redução da perda de líquido. O aumento adicional na intensidade do tratamento, até níveis entre 200 e 300 MPa / 15 min, pode ter causado desnaturação das proteínas miofibrilares, compactação dos tecidos e fragmentação da estrutura miofibrilar, contribuindo para o aumento da perda de líquido até níveis similares ao controle. Já a redução da perda de líquido observada no tratamento mais intenso (400 MPa / 15 min), pode se relacionar ao efeito da geleificação das proteínas. No entanto, esses mecanismos propostos precisam ser avaliados em futuras avaliações através do uso de técnicas analíticas avançadas para melhor elucidação.

3.5 Análise de Componentes Principais e Clusters

Análise de Componentes Principais (ACP) é uma ferramenta de análise multivariada capaz de converter uma representação N-multidimensional de um objeto em uma representação com reduzido número de dimensões, que viabilize a observação gráfica. Nessa pesquisa, essa técnica converteu cada tratamento (objetos multidimensionais caracterizados pelo conjunto de variáveis respostas) em estrutura bidimensional (abscissa vs coordenada) que permita avaliação dos mesmos.

Para realização dessa análise, as variáveis pH e índices de cor foram representados, respectivamente, pelos índices ΔpH e índices absolutos de cor (leitura direta das amostras pressurizadas). Os dois primeiros componentes principais (CPs) explicam 78,82 % da variância do experimento (CP1: 65,45 % e o CP2: 12,44 %) enquanto que CP1 x CP3 (CP3: 11,10 %) explicam 72,01 % (Figura 7). No diagrama CP1 x CP2 (Figura 7a) todas as variáveis resposta exibiram vetores de tamanho máximo (próximo de -1 ou 1), sugerindo que a variabilidade de todos eles estão adequadamente representadas nessa figura. Única exceção foi o vetor perda de líquido, mas que assumiu a mesma condição no diagrama CP1 x CP3 (Figura 7b).

No diagrama PC1 x PC2 (Figuras 7a e 7b), a proximidade dos vetores ΔpH , força de cisalhamento (FC), b^* , L^* WI^* e H^* sugere forte correlação entre eles, o que é ilustrado pela Tabela 03. Já o índice de cor a^* e C^* nesse mesmo diagrama (Figura 7a), e a perda de líquido no diagrama PC1 x PC3 (Figura 7b), se localizaram em regiões opostas ao primeiro grupo de variáveis e não exibe correlação significativa com nenhuma delas (Tabela 03).

O agrupamento das variáveis ΔpH , FC, b^* , L^* WI^* e H^* sugere que elas são influenciadas pelos tratamentos de APH de forma semelhante (variáveis aumentaram com aumento da intensidade dos tratamentos), e conforme discutido anteriormente, provavelmente por mecanismos relacionados à intensidade da desnaturação das proteínas.

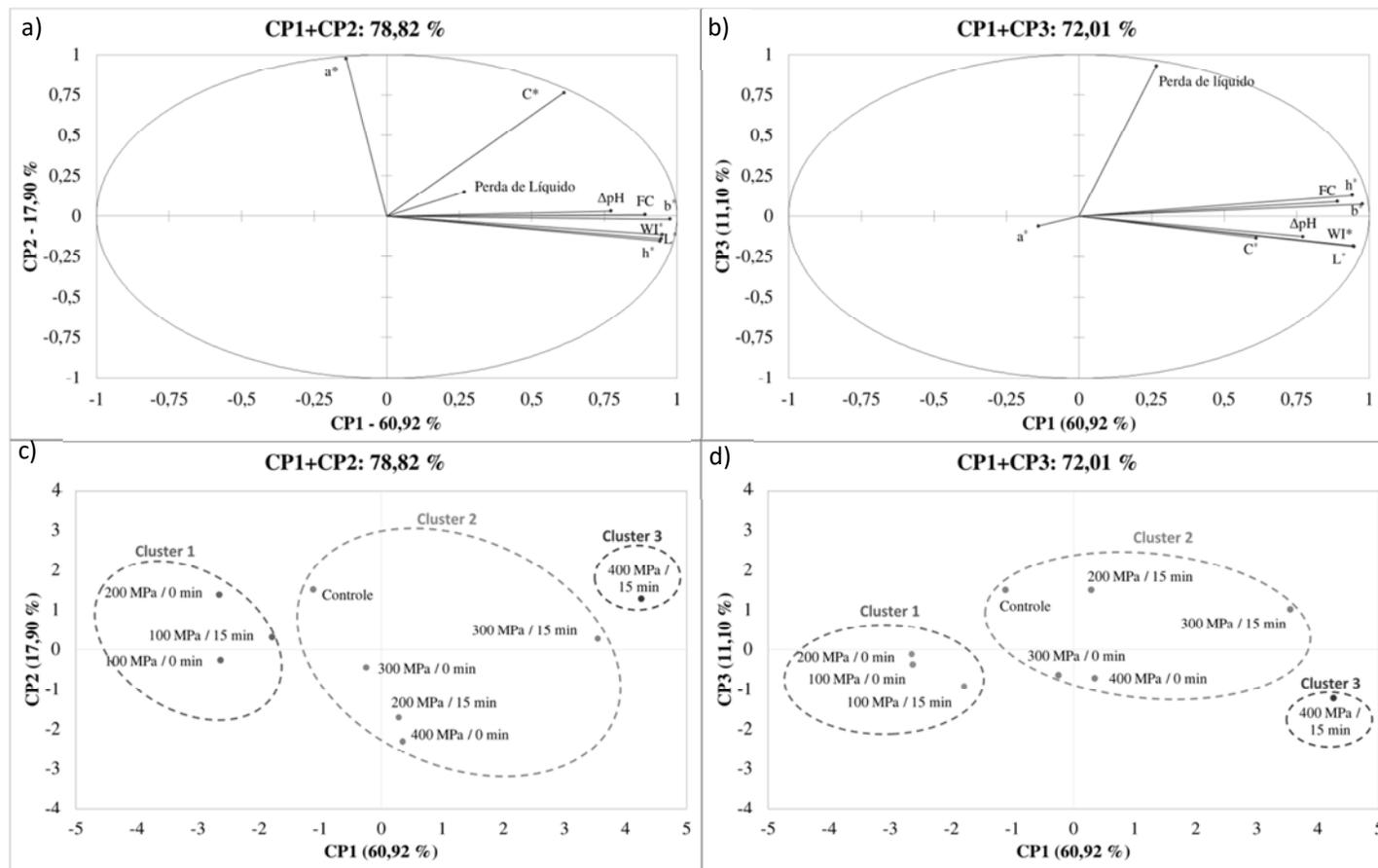


Figura 7 – Análise de Componentes Principais (PC1+PC2 (a) e PC1+PC3 (b)), e representação de Clusters (PC1+PC2 (c) e PC1+PC3 (d)) de acordo com índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h^* , WI^*), perda de líquido, ΔpH e força de cisalhamento em filé de sardinhas controle e pressurizadas a 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min.

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Pearson para perda de líquido (PL), força de cisalhamento (FC), ΔpH e índices de cor (L*, a*, b*, C*, h* e WI*) em filé sardinha controle e pressurizada por 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 or 15 min.

Variáveis	L*	a*	b*	C*	h*	WI*	PL	ΔpH	FC
L*	1								
a*	-0,245	1							
b*	0,870	-0,143	1						
C*	0,534	0,641	0,556	1					
h*	0,838	-0,256	0,982	0,412	1				
WI*	1,000	-0,267	0,867	0,513	0,840	1			
PL	0,096	0,026	0,288	0,174	0,294	0,095	1		
ΔpH	0,738	-0,130	0,710	0,539	0,632	0,733	0,176	1	
FC	0,800	-0,065	0,921	0,497	0,921	0,798	0,244	0,434	1

Valores em negrito são significativos ($p \leq 0,05$).

Já a localização oposta de a* (Figura 7a e 7b) e a ausência de correlação com demais variáveis (Tabela 03) pode ser atribuída ao fato de esse índice ser influenciado por mecanismos distintos daqueles. É possível que o índice de cor a* seja influenciado pela interação entre a HPP e o potencial de oxidação do meio (AMANATIDOU, 2000). Carne bovina exibiu redução de a* variável de acordo com potencial de oxidação do meio e nível de pressão, tendo exibido relativa estabilidade dessa variável até 350 MPa em condição de mais baixa ou ausente concentração de oxigênio, e reduções mais intensas em níveis mais elevados com concentração de oxigênio média e alta (CARLEZ, VECIANA-NOGUES e CHEFTEL, 1995).

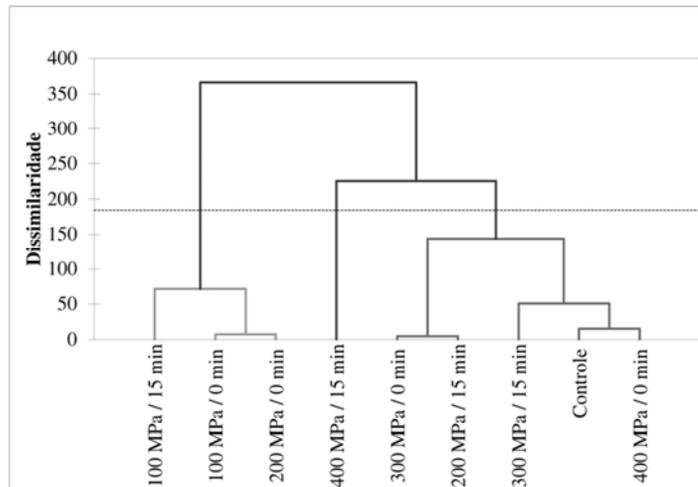
O vetor perda de líquido exibiu baixa explicação da variância no diagrama PC1 x PC2 (Figura 7a) e posicionamento isolado no diagrama PC1xPC3 (Figura 7b) e, logo, não exibiu correlação significativa com nenhuma das demais variáveis (Tabela 3). Apesar do resultado, o comportamento da perda de líquido pode ser relacionado com o comportamento da força de cisalhamento. Nos tratamentos de intensidade mais baixa (100 e 200 MPa / 0 min e 100 MPa / 15 min), ambas as variáveis exibiram valores reduzidos em relação aos demais níveis de pressão e inferiores ao controle. Esse comportamento corrobora a hipótese de que baixos níveis de APH podem contribuir para aumento retenção de líquido e redução da FC. Por outro lado, no nível mais intenso avaliado (400 MPa / 15 min), houve aumento da FC em detrimento à redução da perda de líquido, o que contribui para reduzir a correlação matemática entre as duas variáveis. Nessa intensidade de tratamento, o aumento da FC pode ter sido mais influenciado por outro mecanismo, como a possível compactação das fibras.

Os diagramas (Figure 7c and 7d) ilustram a formação de três clusters: **cluster 1**) 100 – 200 MPa / 0 min, e 100 MPa / 15 min; **cluster 2**) Controle, 300 – 400 MPa / 0 min, e 200 – 300 MPa / 15 min; e **cluster 3**) 400 MPa / 15 min. Essa formação de *cluster* claramente agrupou os tratamento de acordo com a intensidade: baixa intensidade (*cluster 1*), de intensidade moderada e controle (*cluster 2*), e de alta intensidade (*cluster 3*).

Destaca-se entre esses resultados a presença do tratamento controle no *cluster 2*, sugerindo que o controle se assemelha mais aos tratamentos do *cluster 2* (intensidade moderada) do que aos tratamentos do cluster 1 (baixa intensidade). O dendograma (Figura 8)

ratifica essa observação, ao demonstrar maior semelhança do controle com o tratamento 400 MPa / 0 min e posteriormente com o tratamento 300 MPa / 15 min. Possivelmente esse posicionamento foi influenciado pelo fato dos tratamentos do *cluster* 1 terem promovido redução na perda de líquido e força de cisalhamento em relação ao controle, e os tratamentos do *cluster* 2 terem promovido menores alterações nas mesmas variáveis em relação ao controle.

Figura 8 – Dendograma dos tratamentos da APH (100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 ou 15 min) e controle quando observado os efeitos sobre as variáveis índices de cor (L^* , a^* , b^* , C^* , h^* e WI^*), perda de líquido, ΔpH e força de cisalhamento em filés de sardinha brasileira.



4. CONCLUSÃO

Os níveis de pressão (100, 200, 300 e 400 MPa) e tempo de processo (0 e 15 min) proporcionaram alterações nas variáveis de qualidade avaliadas: cor, pH, força de cisalhamento e perda de líquido. No entanto, as alterações proporcionadas pelos níveis intermediários de pressurização (300 e 400 MPa / 0 min e 200 e 300 MPa / 15 min) exibiram, de maneira geral, maior similaridade ao controle não pressurizado. Esse resultado motiva realização de novas pesquisas sobre efeito desses mesmos níveis de pressão sobre a estabilidade oxidativa das carnes, que são fundamentais para avaliação da viabilidade do processamento de filé de sardinha por APH. Porém, fica evidente pelo presente estudo que o processo pode promover alterações favoráveis ou, ao menos, manter as características do filé de acordo com os níveis e tempo e pressão utilizados. Adicionalmente, tornam-se necessárias pesquisas que avaliem o comportamento dos consumidores diante dos efeitos observados, a fim de se concluir sobre o potencial benéfico ou depreciativo dessas alterações.

5. REFERÊNCIAS

As referências citadas no presente capítulo bem como todas as demais citadas em toda a tese estão apresentadas em sessão única no final da tese

CAPÍTULO III

ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE FILÉ DE SARDINHA BRASILEIRA (*SARDINELLA BRASILIENSIS*) TRATADA POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO.

RESUMO: avaliações prévias do processamento de sardinha entre 100 e 400 MPa por 0 ou 15 min demonstram que as amostras tratadas a 200 MPa ou 300 MPa por 15 min, e 300 MPa ou 400 MPa por 0 min são as que mais se assemelham ao controle fresco quando analisados imediatamente após aplicação dos tratamentos. Com objetivo de avaliar a estabilidade (5 ± 2 °C por 21 dias) da qualidade física e química, a presente pesquisa verificou que capacidade de retenção de água, umidade e atividade de água não foram expressivamente influenciados pela APH. Já pH, índices de cor e força de cisalhamento, apesar de exibirem algum grau de alterações logo após aplicação da APH, podem exibir tendência de atenuação ou reversão dos efeitos durante o armazenamento, em extensão variável de acordo com nível de APH. Não houve indício de que os níveis de APH avaliados sejam capazes de catalisar oxidações lipídicas e proteicas em intensidade significativa no período, principalmente, até o 14° dia.

Palavra chave: isostático, carbonila, TBARs, oxidação, pescado

ABSTRACT: previous data of sardine processed between 100 and 400 MPa for 0 or 15 min demonstrate that samples treated at 200 MPa or 300 MPa for 15 min, and 300 MPa or 400 MPa for 0 min are the ones that most resemble the fresh control when analyzed immediately after the treatments. In order to evaluate the stability (5 ± 2 °C for 21 days) of physical and chemical quality attributes, this research verified that water retention capacity, moisture and water activity were not influenced by the HHP. However, pH, color indexes (L^* and a^*) and shear forces, although exhibiting some degree of alterations shortly after HHP application, may show a tendency of attenuation or reversion of effects during storage, in variable extension according to the level of HHP. There was no evidence that the HHP levels evaluated were able to catalyze lipid and protein oxidations at a significant intensity in the period, mainly until the 14th day

Keywords: isostatic, carbonil, TBARs, oxidation, seafood

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre o processamento de alimentos por Alta Pressão Hidrostática (APH) se iniciaram no final do século XIX com o processamento de leite, e, atualmente, há mais de 350 unidades industriais em todo o mundo, processando diversas matrizes (HUANG et al., 2017). Sua disseminação mundial está relacionada ao fato de ser uma tecnologia não térmica com potencial de preservar os principais aspectos de qualidade, mantendo-os em patamares similares aos encontrados nos produtos frescos. O crescimento do mercado e o desenvolvimento das pesquisas revelaram diversas potencialidades do processo, como alteração em propriedades reológicas de matrizes contendo biopolímeros, alteração na atividade de enzimas presentes ou aplicadas em alimentos, redução do potencial alergênico de alimentos ou ingredientes, contribuição para redução de sal em formulações, auxiliar na desossa de frutos do mar, potencialização da extração de compostos bioativos, entre outros (HUANG et al., 2014; BARBA et al., 2015). No entanto, a mais tradicional e também mais frequentemente aplicação está relacionada à capacidade de conservar os alimentos, através da eliminação de microrganismos e inibição de enzimas deteriorantes.

A extensão dos benefícios advindos da aplicação da APH mostra-se fortemente dependente das matrizes avaliadas e da intensidade do processo (relacionada ao nível de pressão e tempo de tratamento). Assim como na aplicação do calor nos processos térmicos, observa-se que os efeitos positivos da APH progridem até intensidade “ótima” de processo, a partir da qual observa-se a ocorrência de efeitos adversos. Em peixes, a intensidade demasiada pode causar diversos efeitos indesejáveis na qualidade. Oxidação lipídica e proteica e clareamento da carne de peixes exibem mecanismos semelhantes e podem ser potencializados a partir de 350 MPa (FAUSTMAN et al., 2010; MEDINA-MEZA, BARNABA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; GUYON, MEYNIER e LAMBALLERIE, 2016). A textura pode ser alterada em maior ou menor grau de acordo com a matriz, níveis de pressão e tempo de processamento (CHÉRET et al., 2005; JO et al., 2014). A capacidade de retenção de água pode ser influenciada a partir de 200-400 MPa (CHÉRET et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2014a). Por outro lado, a eliminação de microrganismos deterioradores e patogênicos não esporulados exhibe maior eficiência a partir de 300 MPa (HUANG et al., 2014). De maneira geral, para a maioria dos índices de qualidade, a faixa entre 200 e 400 MPa é crítica para a eficiência do processamento por APH, sendo a intensidade “ótima” fortemente influenciada pela espécie de peixe.

Dessa forma, o desenvolvimento e otimização de um processamento de peixe por APH requer investigações específicas. Atualmente há grande quantidade de pesquisas publicadas sobre os efeitos da APH na qualidade de diversos peixes e frutos do mar em todo o mundo, uma vez que esse mercado representa cerca de 5 % de todo alimento pressurizado e exhibe tendência de crescimento (HUANG et al., 2017). No entanto, observa-se predominância de espécies de alto valor agregado como robalo (CHÉRET et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2014a) bacalhau (MONTIEL et al., 2012), salmão (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; ERKAN et al., 2011), ostras e outros bivalves (CRUZ-ROMERO, KERRY e KELLY, 2008; YI et al., 2013a), camarão (BINDU et al., 2013; KAUR et al., 2013) e outros. É possível que o aumento de mercado com progressiva redução dos custos do processo, decorrente do aumento de escala e da concorrência entre o crescente número de unidades industriais processadoras e entre os produtores de equipamentos de APH, favoreça a possibilidade de aplicação do processo a peixes de menor valor agregado, consubstanciando produtos diferenciados.

Nesse cenário, a sardinha (*Sardinella* spp.) pode figurar como um peixe de interesse comercial, uma vez que é uma das espécies mais capturadas no mundo (FAO, 2014). Processada mundialmente através de técnicas tradicionais como a esterilização, congelamento ou fermentação, seu processamento por APH pode representar inovação tecnológica capaz de agregar valor superior ao produto final. No entanto, são escassas as pesquisas que avaliam o efeito da APH na qualidade de carne de sardinha. Os artigos mais recentes datam do final dos anos 1990 (WADA e OGAWA, 1996; MONTERO; PEREZ-MATEOS e MONTERO, 1997; PÉREZ-MATEOS e SOLAS, 1997).

O grupo de trabalho desta pesquisa vem realizando estudos com a pressurização de sardinha e os resultados têm se mostrado promissores. Estudos prévios (*Capítulo II*) demonstraram que a carne de filés de sardinhas é sensível à pressurização nos níveis de 100, 200, 300 ou 400 MPa / 0 (pulso unitário, correspondente a depressurização imediata após alcance do set point de pressão) ou 15 min (manutenção da pressão *set point* por 15 min seguido de depressurização), exibindo alterações de textura, pH, perda de líquido e cor. No entanto, foi observado que a carne de filés de sardinha pressurizadas a 200 ou 300 MPa por 15 min, e 300 ou 400 MPa por 0 min exibiram maior semelhança com o controle não pressurizado que os demais tratamentos quando avaliado imediatamente após o processo. Entretanto, não há consistência de informação quanto à estabilidade desses atributos ao longo do período de armazenamento quando tais processos são aplicados. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi realizar tal avaliação e verificar, adicionalmente, a estabilidade oxidativa nas mesmas condições.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletados 40 kg de sardinhas frescas de um mesmo lote, capturado menos de 24 horas antes da coleta, no momento do desembarque no porto de Angra dos Reis (Rio de Janeiro, Brasil – Latitude: 23° 00' 24" S e Longitude: 44° 19' 05" W). Todos os peixes foram transportados em caixas de isopor contendo gelo (proporção superior a 2:1 gelo/sardinha) e mantidos nessa condição por 16 h até os procedimentos de preparo e pressurização. Foram selecionadas sardinhas entre 95 e 110 g (média de 101,31 g) com aspectos de frescor preservados (firmeza, coloração, integridade e aroma característicos).

A amostra selecionada foi lavada (agitação em tanque com água e gelo por aproximadamente 5 min) e submetida, posteriormente, à remoção manual da cabeça (altura da brânquia), cauda (altura do orifício excretor), vísceras, escamas e espinhas. No dia da pressurização (dia 0), todas as unidades, incluindo os controles, foram embalados individualmente em sacos de polietileno selados a vácuo em posição natural do peixe (“não espalmada”, filé dobrado sobre a cavidade abdominal). Imediatamente após o acondicionamento nas embalagens (controle) ou após os ciclos de pressurização, todas as mostras foram acondicionadas em câmara de refrigeração e mantidas a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ por 21 dias, com retirada a cada 7 dias para análises.

2.2 Pressurização

Pressurizações foram realizadas em equipamento piloto de Alta Pressão Hidrostática Stansted Fluid Power S-FL-850-9-W, que possui capacidade de pressurização entre 100 e 900 MPa com controle de temperatura entre 0 e 80 °C. O equipamento possui câmara de pressurização cilíndrica de aço inox (diâmetro de 4 cm, 30 cm de altura e volume útil de 345 ml) e foi operado com solução alcoólica (70 %) como fluido de pressurização. O equipamento promove a pressurização através de bomba hidráulica que desloca um pistão para o interior do cilindro, promovendo taxa de pressurização de 7 MPa.s⁻¹, e exibe despressurização “instantânea”, após o alívio da pressão, ao final do ciclo.

Experimento preliminar (*Capítulo II*) foi conduzido utilizando os níveis 100, 200, 300 ou 400 MPa por 0 min (pulso unitário, correspondente a despressurização imediata após alcance do set point de pressão) ou 15 min (manutenção constante da pressão desejada por esse período), e realizadas análises de pH, cor, perda de líquido e força de cisalhamento. Análise de cluster demonstrou que os tratamentos 300 MPa / 0 min, 400 MPa / 0 min, 200 MPa / 15 min e 300 MPa / 15 min exibiram maior similaridade (mesmo cluster – p>0,05) ao controle (não pressurizado). No presente artigo, com objetivo de aprofundar as investigações nesses níveis de tratamento, amostras foram pressurizadas nessas mesmas condições de tratamento e avaliadas quanto após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 5 ± 2 °C.

2.3 Análises

Todas as análises foram realizadas em triplicata experimental (três sardinhas – N=3) com pelo menos três repetições analíticas por amostra (triplicata analítica). Cada amostra individual (sardinha) foi analisada conforme as variáveis de resposta descritas a seguir.

2.3.1 Conteúdo de água

Perda de líquido: determinada conforme (CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017), calculada através da diferença de peso da mesma amostra fresca (peso inicial – dia 0) e durante o período de armazenamento, e a diferença expressa em porcentagem em relação ao peso inicial (dia 0). Previamente às pesagens, o líquido exsudado no interior das embalagens foi descartado e a superfície das amostras secas através de suave compressão manual com uma folha de papel absorvente. **Atividade de água:** inserção das amostras previamente maceradas em equipamento (*Aqualab Lite*[®], *Decagon*) com resultados expressos a 25 °C. **Umidade e Capacidade de retenção de água (CRA):** determinadas conforme (SKIPNES, LUND e HENDRICKX, 2007), a umidade foi determinada através da secagem de 2,0000 g de amostra previamente triturada (estufa a 105 °C por 16 horas). A CRA foi calculada pela diferença entre a umidade inicial e a umidade de outra alíquota das mesmas amostras após centrifugação a 1500 g x 15 min, e a diferença expressa em porcentagem em relação a umidade inicial (não centrifugada). Para centrifugação, as amostras foram acondicionadas em papel filtro e inseridas em tubo de vidro contendo gaze ao fundo, em quantidade suficiente para impedir contato da amostra com o tubo e reter o líquido liberado.

2.3.2 Força de cisalhamento (FC)

Foi realizada através de equipamento texturômetro *TA-HDi* (Texture Technologies Corp./ Stable Micro Systems, UK), com probe Warner Bratzler de 1,00 mm de espessura programada com as seguintes velocidades: 4 mm.s⁻¹ para aproximação, 2 mm.s⁻¹ para o corte e retorno a 4 mm.s⁻¹. A força de cisalhamento foi determinada pelo pico de força máxima (g) obtida na curva de deformação. Meias carcaças íntegras dos filés de sardinha foram deixadas a temperatura ambiente por 1 hora previamente à análise, e dispostas com a porção muscular voltada para a probe (corte no sentido músculo → pele) e eixo longitudinal da amostra alinhado perpendicularmente ao eixo de corte da probe. Foram realizados três cisalhamentos em cada meia carcaça, determinando quatro partes de comprimento aproximadamente iguais, após a análise (Figura 1).

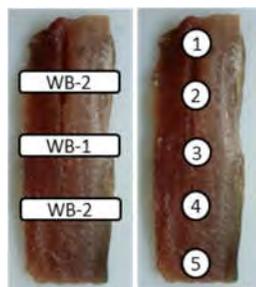


Figura 1 – Meia carcaça do filé de sardinha com posições do corte da lâmina Warner Bratzler para determinação da Força de Cisalhamento (WB-1 a 3) e posições das leituras de cor (1 a 5).

2.3.3 pH

Alíquota de 1,00 grama de amostra previamente triturada foi homogeneizada vigorosamente com 4 ml de água destilada e centrifugada a 1.500 g x 5 min para remoção de partículas em suspensão que pudessem interferir nas leituras. O pH foi determinado por inserção de sonda potenciométrica no sobrenadante.

2.3.4 Cor

A superfície interna dos filés (porção cárnea, lado oposto à pele) foram avaliadas utilizando equipamento Chromameter CR-300 (Minolta Camera Co., Osaka, Japan) previamente calibrado, cujo iluminante foi o D65 e ângulo de observação foi 10°. A partir dos valores de L^* , a^* e b^* , foi determinada a diferença global de cor ($\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$). Para cálculo de ΔE valores de L^* , a^* e b^* do controle fresco (dia 0) foram adotados como referência. Foram realizadas cinco leituras ao longo da porção central do eixo longitudinal de uma meia carcaça de cada amostra (Figura 1).

2.3.5 Taxa de oxidação lipídica (TBARs)

Oxidação lipídica (TBARs) foi determinada de acordo com Yin et al. (1993). Alíquota de 5,0 gramas de amostra previamente triturada foi homogeneizada com 22,5 ml de ácido tricloroacético (TCA, solução 11%) e filtrado em papel Whatman n° 1. Posteriormente, 1 ml do filtrado foi adicionado a 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA, solução 20 mM) e incubado a

25 °C por 20 horas. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foram quantificadas através da leitura da absorvância a 532 nm (espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). O controle analítico foi realizado através da análise da mistura de 1 ml da solução TCA e 1 ml da solução TBA através do mesmo procedimento.

2.3.6 Taxa de oxidação de proteínas (Carbonilas)

A formação de carbonila total é um dos mais relevantes indicadores de oxidação de proteínas de origem animal (ESTEVEZ, 2011). Nessa pesquisa foi determinado de acordo com Oliver, Ahn, Moerman, Goldstein, e Stadtman (1987) seguindo modificações feitas por Armenteros, Heinonen, Ollilainen, Toldra, e Estevez (2009) e Mercier, Gatellier, Viau, Remignon, & Renerre, (1998). Alíquota de 3,0 gramas foi homogeneizada com 30 ml de solução de KCl 0,15 M pH 7,4 por 90 segundos (Ultra Turrax T18, IKA, Wilmington, NC, USA). O homogenato foi dividido em duas partes iguais e individualmente homogeneizado com 1 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA 10%) e centrifugado a 5.000g x 5 min (4°C) para precipitação das proteínas. Cada pellet formado foi, separadamente, resuspendido com 1 ml de HCl 2N ou 1 ml DNPH (10 mM em HCl 2N) para quantificação, respectivamente, dos teores de proteína e carbonila total. Os homogenatos foram incubados a 25 °C por 1 hora, com agitação a cada 15 min, adicionados ao final desse período de 1 ml de TCA 10% e centrifugados a 11.000g x 10 min (4°C). O precipitado formado foi lavado três vezes com 1 ml de solução etanol / acetato de etila (1:1) e novamente centrifugado a 15.000g x 10 min (4°C). Os pellets foram resuspendidos em 1,5 ml de solução tampão 20 mM de fosfato de sódio pH 6,5 e 6 M de cloridrato de guanidina e centrifugados a 11.000g x 10 min, para remover partículas insolúveis. O teor de proteína foi estimado através da leitura da absorvância a 280 nm (curva padrão obtida a partir de soroalbumina bovina) e teor de carbonila através da absorvância a 370 nm e coeficiente de absorvância da hidrazona (21,0 mM⁻¹ cm⁻¹). Os resultados foram expressos em nmol de carbonila por grama de proteína.

2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada em software XLSTAT versão 2016.02.28451 (Addinsoft, Paris, França). Os efeitos dos tratamentos (APH) e do período de armazenamento foram avaliados separadamente através de análise de variâncias independentes (ANOVA, one-way). Efeitos da APH foram avaliados através da comparação de cada tratamento com o controle (teste de Dunnet) e comparação entre os diferentes níveis dos tratamentos de APH (testes de Tukey). Diferenças durante o armazenamento, em todos os tratamentos de APH e no controle, foram avaliadas através do teste de Tukey. Em todas as avaliações foi adotado p = 0,05.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Conteúdo de água e parâmetros relacionados

O conteúdo de água e parâmetros relacionados dos filés de sardinha, controle e submetidos a APH, são apresentados na Tabela 1. O controle exibiu **umidade** estável e **atividade de água** oscilando ligeiramente em torno do valor inicial, durante o armazenamento. Já a **perda de líquido** exibiu estabilidade até o 7º dia (5,33 – 6,11 %), passando a aumentar progressivamente até o final do armazenamento (8,45 % no 14º dia e 10,77 % no 21º dia). A **capacidade de retenção de água (CRA)** do controle aumentou de

Tabela 1 - Conteúdo de água e parâmetros relacionados (perda de líquido, capacidade de retenção de água umidade e atividade de água) de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH, durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).

Parâmetros / Tratamentos	Período de Armazenamento			
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
<i>Umidade(%)</i>				
Controle	74,04 ± 0,64	73,58 ± 0,38	71,94 ± 2,11	74,85 ± 0,81
300 MPa / 0 min	73,30 ± 0,95	71,78 ± 2,28	71,70 ± 1,53	73,82 ± 1,02
400 MPa / 0 min	74,17 ± 0,88 ^A	72,74 ± 0,81 ^{AB}	71,23 ± 0,73 ^B	74,25 ± 1,03 ^A
200 MPa / 15 min	73,95 ± 1,70	72,62 ± 0,36	71,92 ± 1,27	74,50 ± 0,40
300 MPa / 15 min	72,98 ± 1,00 ^{AB}	72,88 ± 0,71 ^{AB}	69,99 ± 1,69 ^B	74,89 ± 1,86 ^A
<i>Atividade de Água – Aw</i>				
Controle	0,979 ± 0,003 ^{AB}	0,991 ± 0,003 ^A	0,984 ± 0,004 ^{AB}	0,975 ± 0,008 ^B
300 MPa / 0 min	> 0,992 ± 0,002	0,992 ± 0,004 ^a	0,983 ± 0,004	0,988 ± 0,005 ^b
400 MPa / 0 min	> 0,991 ± 0,003 ^{AB}	0,991 ± 0,003 ^{a,AB}	0,988 ± 0,003 ^B	> 0,995 ± 0,001 ^{ab,A}
200 MPa / 15 min	> 0,987 ± 0,003 ^B	0,978 ± 0,002 ^{b,C}	0,990 ± 0,004 ^B	> 0,999 ± 0,001 ^{a,A}
300 MPa / 15 min	> 0,989 ± 0,003 ^{AB}	0,984 ± 0,004 ^{ab,AB}	0,986 ± 0,004 ^B	> 0,997 ± 0,007 ^{ab,A}
<i>Perda de líquido (%)</i>				
Controle	5,33 ± 0,11 ^C	6,11 ± 0,31 ^C	8,45 ± 0,70 ^B	10,77 ± 0,28 ^A
300 MPa / 0 min	> 8,59 ± 0,04 ^{a,C}	> 10,34 ± 0,43 ^B	> 13,31 ± 0,98 ^A	> 13,91 ± 0,38 ^{a,A}
400 MPa / 0 min	> 8,89 ± 0,06 ^{a,B}	> 10,21 ± 0,20 ^B	> 13,06 ± 1,44 ^A	10,80 ± 0,38 ^{b,B}
200 MPa / 15 min	> 7,98 ± 0,19 ^{b,B}	> 9,50 ± 0,83 ^B	11,07 ± 1,95 ^{AB}	> 13,54 ± 1,10 ^{a,A}
300 MPa / 15 min	5,13 ± 0,36 ^{c,B}	8,00 ± 0,75 ^B	11,02 ± 0,99 ^A	10,82 ± 0,72 ^{b,A}
<i>Capacidade de retenção de água – CRA(%)</i>				
Controle	95,82 ± 0,75 ^B	98,94 ± 0,85 ^A	98,81 ± 0,13 ^A	97,93 ± 1,69 ^{AB}
300 MPa / 0 min	94,06 ± 0,93 ^B	98,35 ± 1,05 ^A	99,07 ± 0,39 ^A	97,72 ± 0,92 ^A
400 MPa / 0 min	93,89 ± 1,29 ^B	98,88 ± 0,63 ^A	98,96 ± 0,90 ^A	97,07 ± 0,19 ^A
200 MPa / 15 min	94,99 ± 1,76 ^B	98,94 ± 0,49 ^A	98,55 ± 1,37 ^A	97,19 ± 0,86 ^{AB}
300 MPa / 15 min	96,05 ± 0,68 ^B	99,74 ± 0,89 ^A	98,78 ± 1,69 ^{AB}	95,98 ± 0,84 ^B

Resultados expressos através de média ± desvio padrão (N=3)

[>] Médias, dentro da mesma coluna, são significativamente superiores ao tratamento controle (p≤0,05);

^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas, dentro da mesma coluna, indicam diferenças significativas (p≤0,05);

^{A,B,C} Diferentes letras maiúsculas, dentro da mesma linha, indicam diferenças significativas (p≤0,05);

95,82 % no dia 1 para 98,81 – 98,94 % entre os dias 7 e 14, e exibiu ligeira redução no 21º dia para 97,93 %. O aumento da **perda de líquido** pode estar relacionado a alterações

estruturais nos tecidos, como rompimento de membranas e migração de água para o espaço extracelular, e desnaturação e redução da solubilidade das proteínas, compactação do tecido e atividade de enzimas autolíticas (SARMA; SRIKAR; REDDY, 1999; GHALY et al., 2010; LIU et al., 2013). Já o aumento da **CRA** durante o armazenamento pode ter relação com o “afrouxamento” do arranjo das miofibrilas causado por enzimas endógenas relacionadas à degradação da desmina e liberação da α -actinina (ZENG, LI e ERTBJERG, 2017).

O principal parâmetro influenciado pela APH foi a **perda de líquido**. Houve, de maneira geral, aumento em relação ao controle, ainda que o aumento da intensidade da APH tenha exercido efeito inverso (Tabela 1). Em relação ao armazenamento, enquanto o tratamento 300 MPa / 0 min promoveu aumento da perda de líquido em relação ao controle durante todo o período, de estocagem, o acréscimo de 15 min no processo (300 MPa / 15 min) promoveu estabilidade da perda de líquido, similar ao controle no mesmo período. Da mesma forma, o aumento de intensidade em 100 MPa (300 MPa / 0 min para 400 MPa / 0 min ou 200 MPa / 15 min para 300 MPa / 15 min) minimizou ou reverteu o aumento da perda de líquido em relação ao controle nos dias 1 e 21. Não houve diferença significativa entre os valores de perda de líquido decorrentes dos diferentes níveis de APH nos dias 7 e 14, ainda que os processos de APH tenham promovido perda de líquido superior ao controle.

CRA e umidade foram apenas pontualmente influenciadas pela APH, e a **Aw** exibiu discreto aumento em relação ao controle no dia 1 (0,979 para 0,987 – 0,992) e dia 21 (0,975 para 0,988 – 0,999), independente dos níveis dos tratamentos (Tabela 1). De fato, não é esperado que a APH influencie diretamente a umidade, uma vez que no processo não há transferência de massa entre amostra e o meio, e não é esperado haver quebra ou formação de moléculas de água internamente às amostras. Eventual efeito poderia ser consequência da maior ou menor perda prévia de líquido por exsudação que, apesar de ter ocorrido nessa pesquisa, aparentemente não influenciou a umidade. Antagonicamente, apesar de a APH ter causado redução da CRA em salmão, foi observado simultaneamente aumento da umidade (LAKSHMANAN, PARKINSON e PIGGOTT, 2007), e alterações na CRA não influenciaram a umidade em halibut (OLSSON et al., 2003). Sobre a **Aw**, considerando que peixes e frutos do mar frescos exibem elevada **Aw** (\approx 0,98-0,99), a ocorrência eventual de aumentos nominalmente reduzidos nessa faixa de **Aw**, como observados nessa pesquisa (0,007 a 0,024), não exibe potencial para influenciar sua estabilidade e, por isso, tende a ser irrelevante.

Apesar de a **perda de líquido** e **CRA** expressarem propriedades similares, induzindo expectativa quanto à correlação entre os resultados, essa tendência não foi observada nessa pesquisa. No mesmo sentido, também não foi observado correlação, ainda que inversa, entre **perda de líquido** e **umidade** neste estudo. Corroborando com esses resultados, robalo pressurizado a 100-500 MPa / 5 min (CHÉRET et al., 2005) e *ocean perch*, bacalhau e arenque, descongelados sob pressão constante de 200 MPa (SCHUBRING, 2005), não exibiram correlação clara entre perda de líquido de CRA. Na presente pesquisa, é possível que a perda de líquido e a CRA tenham sido influenciadas pelo preparo das amostras. É esperado que a perda de líquido tenha sido fortemente influenciada por forças capilares e pela interação eletrostática água-proteína (filés inteiros). Já a CRA, possivelmente foi pouco ou nada influenciada por forças capilares e pode ter sido mais intensamente influenciada pela eventual formação de emulsão ou gel, uma vez a análise se deu na amostra macerada. Corroborando com essa hipótese, (SKIPNES, LUND e HENDRICKX, 2007) demonstraram que a forma de preparo da amostra e os parâmetros de avaliação podem influenciar o valor da CRA. No

entanto, não foi observada correlação entre perda de líquido e CRA mesmo quando as amostras foram avaliadas nas mesmas condições (íntegras) (SCHUBRING, 2005).

O aumento da perda de líquido causado pela APH pode estar relacionado à adicional desnaturação das proteínas, compactação das fibras, e fragmentação das estruturas miofibrilares causadas pelo processo (SUZUKI, WATANABE e IWAMURA, 1990; PEREZ-WON, TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; TRUONG et al., 2015; ZHANG et al., 2015; CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017). Já a progressiva atenuação com aumento da intensidade da APH pode se estar relacionada à progressiva geleificação das proteínas (MONTERO, PÉREZ-MATEOS e SOLAS, 1997; PEREZ-MATEOS e MONTERO, 1997; HSU e KO, 2001; SILVA, FOGUEL e ROYER, 2001; TORNBERG, 2005; TRUONG et al., 2015).

Os resultados para conteúdo de água encontrados em diversos estudos sobre aplicação de APH em peixes e frutos do mar são variados. A CRA de badejo pressurizado (100-400 MPa / 0 ou 5 min) não foi influenciada pela APH imediatamente após o processo (TEIXEIRA et al., 2014a), enquanto abalone exibiu redução da CRA a 400 e 500 MPa após o processo e ao longo do armazenamento (JO et al., 2014). Sea bream pressurizada exibiu redução da CRA com a pressurização (200-400 MPa / 10 min) sem que tenha havido efeito do período de armazenamento (CAMPUS et al., 2010). O efeito da APH sobre a **umidade** em peixes e frutos do mar pode não ser observado ou haver ligeiro aumento ou redução inferior a 1 % (RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006; ORTEA et al., 2010; BRIONES-LABARCA et al., 2012; KAUR et al., 2013; YI; ZHANG et al., 2013). A **perda de líquido** em camarão aumentou com a pressurização, ainda que não tenha havido efeito do nível de pressão (200, 400, 600 e 800 MPa / 5 min) (JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012). Por outro lado, a perda de líquido de merluza pressurizada aumentou com a intensidade do tratamento e durante o armazenamento (HURTADO, MONTERO e BORDERÍAS, 2000). A **Aw** não foi influenciada pela APH em camarão (KAUR et al., 2013; YI et al., 2013b) e ostras (CRUZ-ROMERO, KELLY e KERRY, 2007), ainda que discreto aumento tenha sido observado em bacalhau (MONTIEL et al., 2012) e red abalone pressurizados (BRIONES-LABARCA et al., 2012). Pesquisas demonstram que a APH exerce efeito distinto sobre o conteúdo de água em diferentes peixes, mesmo quando processados e avaliados nas mesmas condições (SCHUBRING et al., 2003; SCHUBRING, 2005; CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017).

3.2 pH

Os valores de pH são apresentados na Tabela 2. O pH do controle se manteve estável (6,25-6,31) até o 14º dia, aumentando para 6,86 no 21º dia. O pH inicial é considerado normal, uma vez que é esperado estar entre 6,0 e 7,0. Os resultados encontrados são similares aos observados em sardinha armazenada a 4 °C por 12 dias ou a 8 °C por 5 dias (CHATZIKYRIAKIDOU e KATSANIDIS, 2011). Já o armazenamento de sardinha em gelo (contato com atmosfera, sem embalagem) aumentou progressivamente entre o 3º e 13º dia de armazenamento (RODRIGUEZ-CASADO et al., 2007). Stamatis e Arkoudelos (2007) demonstraram que a estabilidade do pH durante o armazenamento (3 °C) é fortemente influenciada pela atmosfera de armazenamento. Esses pesquisadores demonstraram que a embalagem a vácuo estabiliza o pH das sardinhas por até 15 dias, e o armazenamento em contato com o ar atmosférico promove aumento progressivo (6,2 até 7,0) no mesmo período. Corroborando com essa hipótese, camarão (2 °C) e ray fish (0 °C) armazenados a vácuo

exibiram pH estáveis até 15 dias de armazenamento (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011; BINDU et al., 2013), e sea bream armazenado em caixa de gelo (sem embalagem) exibiu progressivo aumento ao longo de 15 dias (GRIGORAKIS, TAYLOR e ALEXIS, 2003). O aumento de pH durante o armazenamento se deve a liberação de compostos alcalinos (trimetilamina, dietilamina, amônia, entre outros) por atividade microbológica (STAMATIS e ARKOUELOS, 2007; TEODORO, ANDRADE e MANO, 2007).

Tabela 2 – Valor de pH de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).

Tratamentos	Tempo (dias) de Armazenamento			
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Controle	6,31 ± 0,13 ^B	6,29 ± 0,03 ^B	6,25 ± 0,03 ^B	6,86 ± 0,19 ^A
300 MPa / 0 min	6,16 ± 0,12 ^B	6,26 ± 0,05 ^B	6,14 ± 0,02 ^B	6,94 ± 0,13 ^A
400 MPa / 0 min	6,33 ± 0,22	6,31 ± 0,04	6,20 ± 0,01	6,49 ± 0,28
200 MPa / 15 min	6,20 ± 0,00 ^B	6,23 ± 0,06 ^B	6,26 ± 0,06 ^B	6,89 ± 0,17 ^A
300 MPa / 15 min	6,20 ± 0,07	6,21 ± 0,11	6,23 ± 0,10	6,75 ± 0,44

^{A,B,C} Diferentes letras maiúsculas, dentro da mesma linha, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$)

A APH não influenciou os valores de pH das sardinhas até o 14º dia de armazenamento, uma vez que os mesmos se mantiveram estáveis e similares entre si e em relação ao controle. No entanto, no 21º dia, enquanto os filés de sardinha pressurizados a 300 MPa / 0 min e 200 MPa / 15 min permaneceram similares ao controle e exibiram aumento do pH, os tratamentos 400 MPa / 0 min e 300 MPa / 15 min preservaram o pH estável.

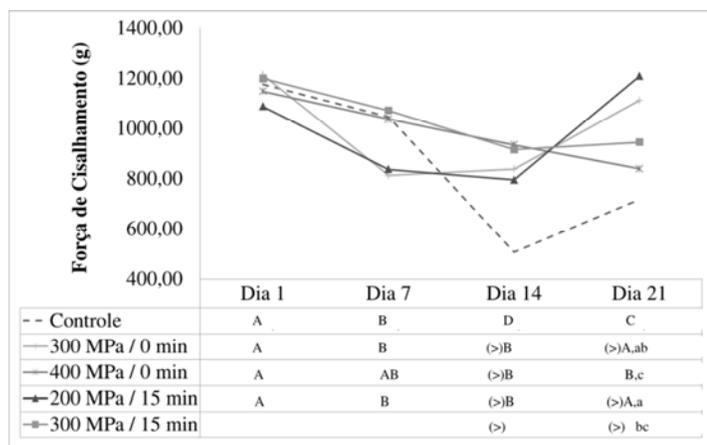
Muitos estudos verificam que o efeito isolado da APH sobre o pH de peixes e frutos do mar (logo após o processo, desconsiderando armazenamento) ainda não foi totalmente elucidado. Não resultou em alteração em ostra (CRUZ-ROMERO, KELLY e KERRY, 2007), salmão (LAKSHMANAN, PARKINSON e PIGGOTT, 2007), camarão (BINDU et al., 2013; KAUR et al., 2013) e robalo (TEIXEIRA et al., 2014a); promoveu aumento de pH em atum (RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006) e abalone (BRIONES-LABARCA et al., 2012); reduziu o pH de salmonete (ERKAN, ÜRETENER e ALPAS, 2010); causou efeito variável em diferentes níveis de APH em bacalhau (MONTIEL et al., 2012) e abalone (JO et al., 2014). Os mecanismos nos quais a APH pode influenciar o pH se relacionam ao efeito de alteração da constante de dissociação da água e ácidos fracos, formação ou quebra de ligações de hidrogênio e aumento ou redução na exposição de grupos alcalinos ou ácidos de radicais das proteínas (CHEFTEL e CULIOLI, 1997; HAYERT, PERRIER-CORNET e GERVAIS, 1999; MA e LEDWARD, 2004; RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006; FULLADOSA et al., 2009; SAMARANAYAKE e SASTRY, 2013). No entanto, ainda não há consenso sobre fatores que determinam ocorrência e/ou predominância de cada um deles.

Já durante o período de armazenamento, é possível que a APH influencie o pH através dos efeitos sobre enzimas e microrganismos. É possível que a estabilidade do pH durante todo o período de armazenamento promovida pelos tratamentos 400 MPa / 0 min e 300 MPa / 15 min esteja relacionada à inibição da atividade microbiana responsável por produção de compostos nitrogenados alcalinos e/ou ácidos orgânicos. Já o aumento do pH observado no dia 21 nas amostras controle e pressurizadas por 300 MPa / 0 min e 200 MPa / 15 min pode

ser consequência da predominância da atividade microbiana e enzimática relacionada à formação de compostos nitrogenados alcalinos, o que sugere menor eficiência desses níveis de pressão em inibir essa microbiota. Logo, o incremento de 100 MPa (200 MPa para 300 MPa a 15 min; ou 300 MPa para 400 MPa a 0 min) mostrou-se crítico para estabilização do pH até o 21º dia. O potencial da APH em inibir enzimas e microrganismos que exibem potencial para alteração do pH através da formação de compostos nitrogenados alcalinos e ácidos orgânicos, durante o armazenamento refrigerado de peixes e frutos do mar, foi demonstrado em diversos estudos (SCHUBRING et al., 2003; RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006; BRIONES-LABARCA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014b; YI et al., 2013a; REYES et al., 2015)

3.3 Força de cisalhamento (FC)

Os resultados da FC (g) são apresentados na Figura 2. O controle exibiu redução da FC durante o armazenamento, tendo apresentado no dia 1 FC de $1175,95 \pm 31,51$ g, e posteriores reduções de 10,9 % no 7º dia, 56,8 % no 14º dia, e 38,9 % no 21º dia. Esse comportamento pode estar relacionado à atividade de proteases endógenas, como as calpaínas e catepsinas (PACHECO-AGUILAR, LUGO-SÁNCHEZ e ROBLES-BURGUENÓ, 2000; LAKSHMANAN, PATTERSON e PIGGOTT, 2005; CHÉRET et al., 2006; OCAÑO-HIGUERA et al., 2011; LERFALL et al., 2015; AHMED, DONKOR e STREET, 2015). No entanto, discreto aumento da FC foi observado entre o 14º e 21º dia, o que pode estar relacionado ao avanço da perda de líquido (*ver sessão 3.1*) associado à possível redução da atividade das enzimas, causado pelo aumento do pH (*ver sessão 3.2*). O comportamento global de redução da FC durante armazenamento também foi observado em outros peixes frescos, como robalo (CHÉRET et al., 2005), carpa (JAIN, PATHARE e MANIKANTAN, 2007), abalone (JO et al., 2014), *hilsa* (CHOUHAN, KAUR e RAO, 2015) e salmão (ALBERTO et al., 2015; LERFALL et al., 2015), ainda que bacalhau, cavala e salmão frescos não tenham exibido alteração da dureza em condições similares (CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017).



Resultados expressos através de média (N=3).

> Médias, dentro da mesma coluna, são significativamente superiores ao tratamento controle ($p \leq 0,05$);

a,b,c Diferentes letras minúsculas, dentro da mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$);

A,B,C Diferentes letras maiúsculas, dentro da mesma linha, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$);

Figura 2 – Força de Cisalhamento (FC) de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).

A APH promoveu atenuação da redução da FC das amostras. Até o 7º dia, os filés tratados por APH exibiram FC similar ao controle, passando à superiores no 14º dia devido forte redução da FC exibida pelo controle. Entre o 14º e 21º dias, houve efeito significativo dos níveis dos tratamentos de APH. Enquanto os tratamentos de nível de pressão mais brandos (300 MPa / 0 min e 200 MPa / 15 min) promoveram tendência de recuperação (aumento) da FC até níveis similares aos observados no 1º dia, os tratamentos de níveis mais intensos (400 MPa / 0 min e 300 MPa / 15 min) preservaram a FC estável no mesmo período. O único tratamento a preservar FC estável ao longo de todo o período foi 300 MPa / 15 min.

Proteínas miofibrilares e do tecido conectivo são as principais responsáveis pelas características de textura de peixes, frutos do mar e carnes de animais terrestres (BUCKOW, SIKES e TUME, 2013; AHMED, DONKOR e STREET, 2015). Alterações promovidas pela APH vêm sendo relacionadas a diferentes efeitos sobre as proteínas, como desintegração da estrutura miofibrilar, desnaturação e agregação das proteínas, compactação das fibras, alteração do arranjo do tecido conectivo (SUZUKI, WATANABE e IWAMURA, 1990; YOSHIOKA e YAMAMOTO, 1998; UENO, IKEUCHI e SUZUKI, 1999; PEREZ-WON, TABILO-MUNIZAGA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; YAGIZ et al., 2007; GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; BRIONES-LABARCA et al., 2012; JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012; BINDU et al., 2013; ZHANG et al., 2015). No entanto, não foi completamente esclarecido quais fatores são responsáveis pela manifestação de cada um desses efeitos. De maneira geral, o efeito isolado da APH (desconsiderando efeito do armazenamento) tende a promover aumento de dureza de acordo com aumento da intensidade do tratamento, como observado em camarão (JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012; BINDU et al., 2013; KAUR et al., 2013; YI et al., 2013b), cavala (AUBOURG et al., 2013), abalone (JO et al., 2014), salmão (YAGIZ et al., 2009), e truta e *mahi mahi* (YAGIZ et al., 2007), ainda que a dureza de abalone (BRIONES-LABARCA et al., 2012) e salmão (GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010) não tenham sido influenciada pela APH, e polvo e robalo (CHÉRET et al., 2005) tenham exibido progressiva redução da FC com aumento da intensidade da APH.

A atenuação da redução de FC durante o armazenamento pode estar relacionada a inibição da atividade das proteases endógenas. A pressurização de sea bass (100 ou 300 MPa / 5 min) causou redução da atividade de calpaínas e catepsinas (D, B e L), e não influenciou atividade das calpastatinas ao longo do período de armazenamento (CHÉRET et al., 2006). Redução na atividade dessas enzimas também foi observada em salmão defumado pressurizado (100, 150, 200 e 300 MPa / 20 min), ainda que tenha havido parcial recuperação da atividade das enzimas cathepsinas B+L e calpaínas, após 12 dias de armazenamento (LAKSHMANAN, PATTERSON e PIGGOTT, 2005). Apesar da APH exibir potencial para inibir atividade das enzimas endógenas de carnes e pescados, os efeitos mostram-se fortemente dependentes da espécie avaliada, e não foi encontrado em toda literatura consultada efeitos específicos da APH sobre as enzimas de sardinhas.

A APH pode influenciar a FC indiretamente, a partir dos efeitos sobre o conteúdo de água (HUFF-LONERGAN e LONERGAN, 2005; DELBARRE-LADRAT et al., 2006). Aos 21 dias, o incremento de 100 MPa a 0 ou 15 min (300 MPa para 400 MPa – 0 min ou 200 MPa para 300 MPa – 15 min) causou redução da FC simultaneamente à redução da perda de líquido. Corroborando com essa hipótese, (LIU et al., 2013) encontraram correlação significativa entre dureza e perda de líquido de carpa armazenada a 0 °C e – 3°C.

Por fim, apesar de os resultados sugerirem que a APH não tenha influenciado a FC dos filés de sardinha após o processo (dia 1), tendência de aumento com incremento da intensidade da APH pode ser considerada se avaliado conjuntamente os resultados das pressurizações a 100 MPa / 0 min e a 400 MPa / 15 min, que promoveram, respectivamente, redução e aumento da FC em relação ao controle (*dados não apresentados*). Redução na FC em tratamentos de baixa intensidade e crescente aumento da FC com aumento da intensidade da APH também foram observados em abalone (JO et al., 2014) e sea bass (CHÉRET et al., 2005).

3.4 Índices de Cor

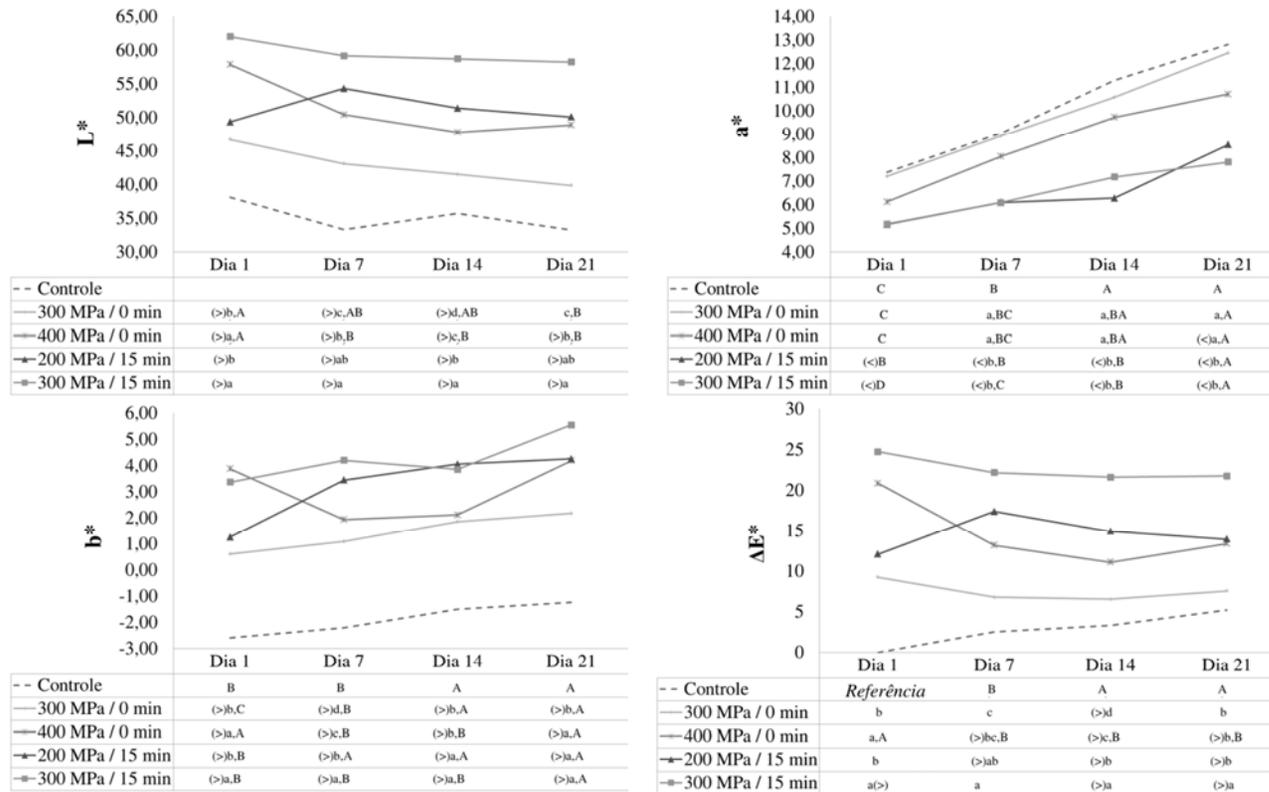
O aspecto visual das sardinhas pressurizadas e armazenadas é apresentado na Figura 3. De maneira geral, ocorre perda do tom vermelho e aumento do clareamento das amostras, o que resulta em aumento da opacidade (perda de luminosidade) e aparência de cozido dos filés de sardinha. Visualmente, esses efeitos são mais intensos nos tratamentos mais longos (15 min), e os tratamentos mais curtos (0 min) são os que preservam maior similaridade com o controle. Esses efeitos foram observados também em diversos outros peixes e frutos do mar, e atribuídos à desnaturação das proteínas (YAGIZ et al., 2007; CRUZ-ROMERO, KERRY e KELLY, 2008; JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012; KAUR et al., 2013). Esses aspectos visuais são corroborados por alterações nos índices de cor discutidos a seguir. Adicionalmente, observa-se aumento do aspecto de ressecamento com aumento do período de armazenamento, o que pode estar relacionado ao aumento da perda de líquido observada no mesmo período.

Os índices de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) são apresentados na Figura 4. Os filés de sardinha controle (não pressurizados) exibiram tendência de aumento de a^* e b^* , e estabilidade de L^* durante o armazenamento. O ΔE^* oscilou entre 2,53 e 3,33 até o 14º dia de armazenamento, e aumentou para 5,20 no 21º dia. De maneira geral, as variações dos índices estão de acordo com os encontrados em sardinha (CHAIJAN et al., 2005) e outros peixes frescos, de características similares (carne vermelha e elevado teor de gordura), como cavala (FIGUEIREDO et al., 2015), truta (YAGIZ et al., 2007) e *oxeye scad* (WONGWICHIAN et al., 2015), e foram relacionados ou atribuídos à oxidação e desnaturação da mioglobina.

A APH causou aumento do índice L^* . Houve aumento do índice em relação ao controle durante todo período de armazenamento, a exceção do tratamento 300 MPa / 0 min no 21º dia. O aumento do nível de pressão (300 MPa para 400 MPa – 0 min; 200 MPa para 300 MPa – 15 min) ou do tempo do processo (0 min para 15 min – 300 MPa) resultou, de maneira geral, em aumento do índice durante todo o armazenamento. Os tratamentos de menor duração (0 min) exibiram discreta tendência à recuperação (redução) do aumento do índice ao longo do armazenamento, enquanto os tratamentos de maior duração (15 min) permaneceram estáveis no mesmo período. Esses resultados podem sugerir que os efeitos dos tratamentos a 0 min exibem maior grau de reversibilidade durante o armazenamento que os tratamentos a 15 min.



Figura 3 – aspecto visual dos filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).



Resultados expressos através de média ± desvio padrão (N=3).

^{>,<} Médias seguidas de ">" ou "<" são, respectivamente, significativamente superiores ou inferiores ao controle dentro do mesmo período de armazenamento ($p < 0,05$);

^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas, dentro da mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$);

^{A,B,C} Diferentes letras maiúsculas, dentro da mesma linha, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$);

Figura 4 - Índices de cor (L^* , a^* , b^* e ΔE^*) de carne de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ\text{C}$).

A APH causou redução do índice a^* quando aplicados tratamentos por 15 min. Os tratamentos a 15 min (200 MPa ou 300 MPa) exibiram valor de a^* inferior aos tratamentos a 0 min (300 MPa ou 400 MPa) e ao controle após o processo (dia 1) e ao longo do armazenamento. No entanto, todos os tratamentos de APH e o controle exibiram recuperação (aumento) de a^* ao longo dos 21 dias de armazenamento

O índice b^* das amostras tratadas por APH exibiram maiores valores que o controle, e ambos exibiram tendência de aumento durante o armazenamento. Apenas o tratamento 400 MPa / 0 min exibiu tendência à estabilidade. Apesar de ter havido diferença significativa entre os tratamentos de APH, não houve tendência clara diante das variações da intensidade da APH. Grande quantidade de pesquisas avaliam os efeitos da APH após o processo e durante o armazenamento sobre índices de cor de peixes e frutos do mar, como em abalone (BRIONES-LABARCA et al., 2012; JO et al., 2014), bacalhau (MONTIEL et al., 2012; CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017), arenque (FIGUEIREDO et al., 2015), *hilsa* (CHOUHAN, KAUR e RAO, 2015), cavala (AUBOURG et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2015; CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017), ostra (CRUZ-ROMERO et al., 2004; CRUZ-ROMERO, KELLY e KERRY, 2007; CRUZ-ROMERO, KERRY e KELLY, 2008; YI et al., 2013a), *oxeye scad* (WONGWICHIAN et al., 2015), arraia (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011), *mullet* (ERKAN, ÜRETENER e ALPAS, 2010), salmão (YAGIZ et al., 2009; GUDBJORNSDOTTIR et al., 2010; ERKAN et al., 2011; LERFALL et al., 2015; CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017), sardinha (CHAIJAN et al., 2005), robalo (TEIXEIRA; et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014b), camarão (JANTAKOSON, KIJROONGROJANA e BENJAKUL, 2012; BINDU et al., 2013; KAUR et al., 2013; YI et al., 2013b; KAUR, SRINIVASA RAO e NEMA, 2016), tilápia (HWANG; LAI; HSU, 2007), truta (YAGIZ et al., 2007), atum (RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006) e carpa (SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006). Alterações de cor variam com intensidade da APH e das espécies mas, de forma geral, são relacionadas à oxidação ou desnaturação dos pigmentos, exibindo estreita relação com oxidação de proteínas e lipídios (FAUSTMAN et al., 2010; ESTÉVEZ, 2011; GUYON, MEYNIER e LAMBALLERIE, 2016)

O aumento de L^* em carnes ricas em heme pigmentos causado pela APH vem sendo relacionado à desnaturação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, e à desnaturação direta da fração proteica dos pigmentos (globina), com a ocorrência ou não de ruptura do anel de porfirina e liberação de ferro livre (CHEFTEL e CULIOLI, 1997; BAK et al., 2012). Bak et al. (2013) observaram que o aumento da pressão promove aumento crescente de L^* em comportamento similar à desnaturação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, e que no nível de APH a partir do qual não se observou adicional desnaturação dessas proteínas, também não se observou adicional variação de L^* . Na presente pesquisa, o aumento de L^* causado pelo incremento de 100 MPa (300 MPa para 400 MPa – 0 min, 200 MPa para 300 MPa – 15 min) pode estar relacionado à intensificação da desnaturação das proteínas, uma vez que desnaturações das principais proteínas acontecem entre 150 e 500 MPa (CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017). No entanto, a atenuação durante o armazenamento causada pelos tratamentos a 0 min (300 MPa ou 400 MPa) pode estar relacionada a ocorrência de modificações estruturais durante o armazenamento, incluindo a “reversibilidade” das desnaturações (DEFAYE et al., 1995; CHEAH e LEDWARD, 1996). Nesse contexto, o tempo de processo pode ter sido crítico nesse processo, uma vez que as alterações causadas pelos tratamentos de APH a 15 min (200 MPa ou 300 MPa) podem ter sido drásticas e irreversíveis durante o armazenamento.

Os efeitos da APH sobre a^* são controversos sendo, possivelmente, influenciados pela espécie (cor da fibra, teor de pigmento, teor de gordura, entre outros), intensidade da APH (níveis de tempo, pressão e temperatura), tipo de armazenamento (tempo, temperatura e atmosfera – vácuo, atmosférica ou atmosfera modificada), e preparo das amostras (em pedaços, filés, moída, entre outros) (SCHUBRING, 2005; YAGIZ et al., 2007; BAK et al., 2013; BINDU et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2015; CHRISTENSEN, HOVDA e RODE, 2017). Adicionalmente, o efeito da APH sobre a^* em carnes vermelhas tende a ser influenciado pelo potencial de oxidação do meio, uma vez que sua redução tem sido relacionada à formação de metamioglobina, pigmento oriundo da oxidação da oximioglobina ou deoximioglobina (CARLEZ, VECIANA-NOGUES e CHEFTEL, 1995; AMANATIDOU, 2000; JUNG, GHOUL e LAMBALLERIE-ANTON, 2003; SCHENKOVA et al., 2007; BAK et al., 2012).

A similaridade entre o índice a^* do controle e das amostras pressurizadas por 0 min (300 MPa ou 400 MPa) sugere que esses tratamentos podem não ter promovido a formação adicional de metamioglobina. Já a redução de a^* , causada pelas pressurizações por 15 min (200 MPa ou 300 MPa), sugere o potencial desses tratamentos em formar metamioglobina. Contrariamente, a recuperação de (aumento) de a^* durante o armazenamento em todos os tratamentos, incluindo o controle, pode ser devido a diminuição na concentração de metamioglobina causada pelo sistema metamioglobina redutase, sistema que pode atuar naturalmente e ser ativado com APH (JUNG, GHOUL e LAMBALLERIE-ANTON, 2003). A taxa de recuperação (aumento) de a^* (inclinação da reta da Figura 1-A) nas pressurizações a 15 min (300 MPa = 0,133; 200 MPa = 0,154) foram inferiores às do controle (0,279) e dos tratamentos a 0 min (400 MPa = 0,229; 300 MPa = 0,259), o que pode sugerir maior grau de inativação do sistema metamioglobina redutase pelos tratamentos mais longos (15 min).

Considerando os efeitos da APH sobre L^* e a^* , observa-se que tratamentos de maior nível de pressão ou maior tempo de duração promovem alterações mais severas e de menor reversibilidade durante o armazenamento. Ou seja, os níveis mais intensos promovem maiores alterações de cor em relação ao peixe fresco, e essas tendem a permanecer durante o armazenamento. Esse comportamento foi ratificado pelo comportamento de ΔE^* , que exibiu tendência de aumento com aumento do nível de pressão ou de tempo durante todo o armazenamento. Já o tratamento 400 MPa / 0 min exibiu redução de ΔE^* durante o armazenamento, o que pode sugerir que durante o armazenamento pode haver reversibilidade das alterações causadas pela APH observadas logo após o processo (dia 0). durante o armazenamento. efeitos causado logo após aplicação da APH

3.5 Taxa de oxidação lipídica (TBARs)

Os valores de TBARs (mg de malonaldeído / kg de amostra – mg Kg⁻¹) são apresentados na Tabela 3. O TBARs do controle se manteve estável (0,674 – 0,787 mg Kg⁻¹) até o sétimo dia de armazenamento, quando exibiu aumento no 14º dia (1,491 mg.Kg⁻¹) e posterior ligeira redução no 21º dia (1,136 mg.Kg⁻¹). Os valores de TBARs até 7 dias das sardinhas podem ser limítrofes para percepção de *flavour* de rancidez, conforme sugerido por (TEIXEIRA e MARQUES et al., 2014). Já o desenvolvimento de odor e texturas inaceitáveis em peixes pode se iniciar até 2 mg Kg⁻¹ (GOULAS e KONTOMINAS, 2007), intensidade que não foi ultrapassada até os 21 dias de armazenamento pelo controle. A evolução da oxidação lipídica de peixe fresco durante o armazenamento se deve ao elevado teor de ácidos graxos insaturados, atividade de microrganismos e enzimas, e oxidações de proteínas e pigmentos

(PACHECO-AGUILAR, LUGO-SÁNCHEZ e ROBLES-BURGUEÑO, 2000; CHAIJAN et al., 2006; WONGWICHIAN et al., 2015; WANG et al., 2017). No entanto, de maneira geral, a concentração de TBARs do controle foi muito inferior às observadas em sardinhas frescas durante o armazenamento por Chatzikyriakidou e Katsanidis (2011) (até 10 mg.Kg⁻¹), Rodriguez-Casado et al. (2007) (até 4,3 mg.Kg⁻¹), Chaijan et al. (2006) (até 600 mg.Kg⁻¹) e Pacheco-Aguilar et al. (2000) (até 35 mg.Kg⁻¹).

Tabela 3 - Oxidação lipídica (TBARs) e proteica (Teor de Carbonila) de filé de sardinha brasileira controle e tratada por APH durante armazenamento por 21 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).

Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
TBARs				
Controle	0,67 ± 0,07 ^B	0,79 ± 0,25 ^B	1,49 ± 0,65 ^A	1,14 ± 0,08 ^{AB}
300 MPa / 0 min	0,55 ± 0,33 ^B	1,35 ± 0,68 ^{AB}	1,71 ± 0,65 ^{a,A}	1,01 ± 0,3 ^{AB}
400 MPa / 0 min	0,7 ± 0,61	0,91 ± 0,32	1,18 ± 0,25 ^{ab}	0,76 ± 0,21
200 MPa / 15 min	0,87 ± 0,22 ^{AB}	1,18 ± 0,17 ^{AB}	(^{<})0,69 ± 0,27 ^{b,B}	(^{<})0,61 ± 0,27 ^B
300 MPa / 15 min	0,71 ± 0,28 ^B	1,05 ± 0,33 ^{AB}	1,34 ± 0,22 ^{ab,A}	(^{<})0,67 ± 0,32 ^B
Teor de Carbonila				
Controle	2,64 ± 1,03 ^B	5,6 ± 0,95 ^A	4,09 ± 1,09 ^{AB}	2,48 ± 0,98 ^B
300 MPa / 0 min	(^{>})6,38 ± 1,97 ^A	4,48 ± 2,38	5,52 ± 1,58	(^{>})5,06 ± 1,1
400 MPa / 0 min	4,16 ± 1,36 ^{ab}	4,69 ± 1,06	4,95 ± 1,61	(^{>})5,43 ± 0,86
200 MPa / 15 min	3,8 ± 0,7 ^b	4,98 ± 1,88	3,69 ± 0,93	(^{>})5,03 ± 0,78
300 MPa / 15 min	3,87 ± 1,62 ^b	3,88 ± 0,84	4,16 ± 2,02	(^{>})5,52 ± 1,14

[>],[<] Médias seguidas de ">" ou "<" são, respectivamente, significativamente superiores ou inferiores ao controle dentro do mesmo período de armazenamento (p<0,05);

^{a,b,c} Diferentes letras minúsculas, dentro da mesma coluna, indicam diferenças significativas (p<0,05);

^{A,B,C} Diferentes letras maiúsculas, dentro da mesma linha, indicam diferenças significativas (p<0,05);

A APH não influenciou o TBARs até o 7º dia de armazenamento, uma vez que amostras pressurizadas em quaisquer dos níveis não diferiram do controle e entre si, e mantiveram-se estáveis nesse período. No período final do armazenamento os tratamentos 200 MPa / 15 min (a partir do 14º dia) e 300 MPa / 15 min (no 21º dia) exibiram redução de TBARs, passando a exibir conteúdo inferior ao controle nesse período. TBARs quantifica compostos de oxidação secundária (fase de terminação) e a reversibilidade da oxidação nesse estágio não é esperada. Dessa forma, essa redução de TBARs pode estar relacionada à instabilidade das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, que pode decompor em oxidações secundárias ou interagirem com proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, com eventual lixiviação através do líquido exsudado durante o armazenamento (NUNES, BATISTA e CAMPOS, 1992; FERNÁNDEZ, PÉREZ-ÁLVAREZ e FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 1997). Comportamento de instabilidade de TBARs também foi observado em truta armazenada a 4 °C por 22 dias (RODRIGUES et al., 2016) e sea bream a 4 °C por 33 dias (GOULAS e KONTOMINAS, 2007). O TBARs do tratamento 400 MPa / 0 min permaneceu estável durante todo o período de armazenamento.

Pesquisas demonstraram que a APH exibiu potencial para aumentar a concentração de TBARs após o processo e/ou ao longo do armazenamento em camarão (100-600 MPa / 5 min (BINDU et al., 2013) ou 300-600 MPa / 3-15 min (KAUR, SRINIVASA e NEMA, 2016), cavala (450-550 MPa / 3-4 min) (MALUENDA et al., 2013), robalo (250-400 MPa / 5 min) (TEIXEIRA et al., 2014b), carpa (100-200 MPa / 15-30 min) (SEQUEIRA-MUNOZ et al., 2006) e truta (150-600 MPa / 15 min) (YAGIZ et al., 2007). Wada e Ogawa, (1996) observaram que APH (200 MPa) aumentou TBARs de sardinha durante 15 dias a 5 °C, ainda que nessa pesquisa as amostras tenham sido armazenadas moídas e em contato com ar atmosférico, o que justifica muito maior concentração de TBARs encontrada (50 a 350 mg.Kg⁻¹). Essas pesquisas relacionaram ou atribuíram o aumento do TBARs ao potencial da APH em promover a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados por promover liberação de ferro livre (atua como catalisador desse processo), rompimento de membranas celulares (exposição de fosfolípídeos de membrana a agentes catalisadores de oxidação), perda de água (inserção via capilares de oxigênio no tecido), e formação de radicais livres oriundos das oxidações de pigmentos e proteína (FAUSTMAN et al., 2010; MEDINA-MEZA, BARNABA e BARBOSA-CÁNOVAS, 2014; GUYON, MEYNIER e LAMBALLERIE, 2016).

Apesar disso, a razoável estabilidade do valor de TBARs dos filés tratados pela APH nessa pesquisa também foi observada em bacalhau defumado (400-600 MPa / 5-10 min) (MONTIEL et al., 2012) e abalone (100-500 MPa / 3 min) (JO et al., 2014).

A formação de TBARs pode ser influenciada por diversos fatores como espécie, integridade da amostra (moída ou íntegra), atmosfera de embalagem (vácuo, oxigênio, atmosfera modificada) e temperatura de pressurização. Recentes publicações sugerem que a APH exibe potencial para promover oxidação lipídica mais intensamente entre 300 e 600 MPa (GROSSI et al., 2014). Dessa forma, a estabilidade do TBARs dos filés de sardinha tratado por APH durante o armazenamento pode estar relacionada à intensidade limítrofe dos tratamentos avaliados. Comportamento similar foi observado em carne de atum, peixe que assim como a sardinha possui elevado teor de ácidos graxos insaturados e alto teor de pigmentos de mioglobina, que também exibiu TBARs estável ou inferior ao controle, após ser pressurizado por até 310 MPa / 6 min e armazenado por 11 dias armazenados a 4°C (RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006). Adicionalmente, os reduzidos e estáveis valores de TBARs encontrados durante todo o armazenamento podem estar relacionados à ausência de oxigênio (embalagem à vácuo) (MARIUTTI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2016), e ao elevado frescor das amostras, utilização abundante de gelo e cuidados com higiene, desde a captura até a realização das análises (higiene e cadeia de frio).

3.6 Taxa de oxidação de proteínas

Os teores de carbonila são apresentados na Tabela 3. O controle apresentou aumento do teor de carbonila entre o 1° e 7° dia, passando a exibir discreta tendência de redução até o 21 ° dia, quando exibiu valor similar ao observado no início do armazenamento. O aumento na concentração de carbonilas de peixes frescos durante o armazenamento foi demonstrado em tilápias (MONTEIRO et al., 2017), cavala (PAZOS et al., 2013; ALBERTOS et al., 2015; BABAKHANI, FARVIN e JACOBSEN, 2016;) e truta (KJÆRSGÅRD, NØRRELYKKE e BARON, 2006). Já a redução do teor de carbonilas durante armazenamento pode ser devido à sua indisponibilização devido a reações com outros componentes do alimento, ou degradação, fragmentação ou agregação das proteínas (BABAKHANI, FARVIN e JACOBSEN, 2016; MERCIER, GATELLIER e RENERRE, 2004).

Os teores de carbonilas das amostras tratadas por APH exibiram comportamentos similares entre si e ligeiramente diferentes do controle. No dia 1, 300 MPa / 0 min promoveu formação de carbonila superior ao controle e aos tratamentos de APH de maior duração (200 MPa / 15 min e 300 MPa / 15 min). Entre o 7º e 21º dia a concentração de carbonila dos filés de sardinha tratados por APH permaneceu estável e similar entre os tratamentos, assumindo valores superiores ao controle no dia 21 em função da redução exibida por esse. Dessa forma, é possível que a APH tenha contribuído para maior estabilização do teor de carbonila.

Devido a escassez de pesquisas sobre oxidação de proteínas em pescados tratados por APH, pesquisas com outras espécies ou que utilizaram outras técnicas para avaliar a oxidação de proteínas são apresentadas. De acordo com Grossi et al. (2014), 600 MPa / 6 min pode causar oxidação de proteínas sarcoplasmáticas (aumento de carbonilas) de carne suína, sem que o mesmo efeito seja observado nas proteínas miofibrilares. Cava et al. (2009) não detectaram efeito de 200-300 MPa 15-30 min sobre oxidação de proteína em produtos cárneos curados. A oxidação de proteína, expressa através da redução da concentração de grupos sulfidrilas, foi observada em todos os tratamentos em *threadfin bream* processado a 200, 400 and 600 MPa / 10, 30 and 50 min (ZHOU et al., 2014) e tilápia a 50 - 200 MPa / 0-60 min (KO, JAO e HSU, 2003) ou 50 - 300 MPa / 10 - 60 min (HSU et al., 2007). Observa-se que os tratamentos relacionados à redução na concentração dos grupos sulfidrilas exibem tempo de processo e/ou intensidade de pressão bastante superiores ao avaliados nessa pesquisa.

A oxidação de lipídios e proteínas pode ocorrer em paralelo ou sequencialmente, podendo os produtos intermediários de um processo catalisar o outro (GUYON, MEYNIER e LAMBALLERIE, 2016). Dessa forma, a estabilidade do teor de carbonilas, observada nessa pesquisa, está de acordo com a estabilidade de TBARs também observada.

4. CONCLUSÃO

A hipótese inicial compreendeu a possibilidade de preservação da qualidade de filés de sardinhas, em níveis similares ao controle, quando avaliados logo após a aplicação do processo (dia 0). Foi observada tendência de preservação desse potencial durante a refrigeração, porém variável conforme o parâmetro de qualidade e tratamento. Durante o armazenamento, a APH (todos os níveis) exibiu potencial para atenuar a perda da força de cisalhamento observada no controle, e reverter, ainda que parcialmente, o aumento de L^* e redução de a^* causada pela própria APH no dia 0. O aumento de pH do controle no 21º dia foi atenuado por 400 MPa / 0 min ou 300 MPa / 15 min, e apesar da APH ter promovido aumento da perda de líquido, esse efeito foi revertido com aumento da intensidade dos tratamentos. Os níveis de APH avaliados não exibiram forte potencial para catalisar oxidações de proteínas ou de lipídios, sugerindo que esses aspectos não tendem a ser limitadores para o processamento nos níveis avaliados, principalmente, até os 14 primeiros dias de armazenamento.

5. REFERENCIAS

As referências citadas no presente capítulo bem como todas as demais citadas em toda a tese estão apresentadas em sessão única no final da tese

CAPÍTULO IV

Formação de compostos nitrogenados e degradação de nucleotídeos em filé sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) tratada por alta pressão hidrostática, durante armazenamento sob refrigeração

RESUMO: formação de compostos nitrogenados e degradação de nucleotídeos são mais clássicos indicadores de qualidade de pescados, uma vez que são influenciados pela atividade microbiana e enzimática autolítica. Na presente pesquisa, juntamente com a caracterização da microbiota inicial contaminante, ambos foram utilizados para avaliar os efeitos da Alta Pressão Hidrostática (300 MPa / 0 min, 400 MPa / 0, 200 MPa / 15 min, ou 300 MPa / 15 min) durante o armazenamento refrigerado (21 dias, 5 ± 2 °C) de filé de sardinha brasileira. As baixas contagens iniciais de bactérias ácido lácticas ($<1,60$ log UFC.g⁻¹), *Enterobacteriaceae* (1,64 UFC.g⁻¹), Psicotróficas ($< 1,60$ UFC.g⁻¹), mesófilas totais (1,88 UFC.g⁻¹) sugerem elevado grau de qualidade das amostras utilizadas. A AMP inibiu a formação de trimetilamina (TMA) e nitrogênio básico volátil total (N-BVT) durante os 21 dias de armazenamento, em intensidade maior nos tratamentos de mais longa duração (200 MPa ou 300 MPa / 15 min). O aumento da intensidade da APH resultou em maior acúmulo de inosina mono fosfato (IMP) e menor acúmulo de inosina (HxR) e hipoxantina (Hx). A adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), e adenosina monofosfato (AMP) exibiram muito baixas concentrações não sendo influenciadas claramente pela APH ou pelo período de armazenamento. As modificações do perfil de nucleotídeos promoveu redução do valor K, principalmente pelo tratamento 300 MPa / 15 min, o que sugere maior preservação do frescor das amostras. Conclui-se que, com os parâmetros avaliados, a APH exibiu eficiência na preservação da qualidade dos filés de sardinha e que os tratamentos de mais longa duração inibiram mais intensamente alterações indesejáveis durante o armazenamento. Palavra chave: adenosina, inosina, peixe, frutos do mar, isostático

ABSTRACT: The formation of nitrogenous compounds and degradation of nucleotides are more classic indicators of fish quality, since they are influenced by the microbial and autolytic activity. In the present research, along with the characterization of the initial contaminant microbiota, both were used to evaluate the effects of the High Hydrostatic Pressure (300 MPa / 0 min, 400 MPa / 0, 200 MPa / 15 min, or 300 MPa / 15 min) during refrigerated storage (21 days, 5 ± 2 °C) of Brazilian sardine fillet. The low initial counts of lactic acid bacteria (<1.60 log UFC.g⁻¹), *Enterobacteriaceae* (1.64 UFC.g⁻¹), psychotrophic ($<1,60$ UFC.g⁻¹), total mesophilic bacteria, 88 CFUg.g⁻¹) suggest a high-quality degree of the samples used. The adenosine monophosphate (AMP) inhibited trimethylamine (TMA) formation and total volatile base nitrogen (N-TVB) during the 21 days of storage, more intensively in longer treatments (200 MPa or 300 MPa / 15 min). The increase in HHP intensity resulted in greater accumulation of inosine mono-phosphate (IMP) and less accumulation of inosine (HxR) and hypoxanthine (Hx). Adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP) exhibited very low concentrations and the influence of HHP or storage period was unclear. The modifications of the nucleotide profile promoted reduction of the K value, mainly at 300 MPa / 15 min treatment, which suggests greater preservation of the freshness of the samples. It was concluded that, according to the parameters evaluated, HHP proved to be efficient in preserving the quality of sardine fillets and that the longer treatments inhibited more strongly undesirable changes during storage. Keywords: adenosina, inosin, fish, seafood, isostatic

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos frescos, não processados e isentos de aditivos conservadores fomenta a busca por processos inovadores de processamento e conservação. Nesse contexto a Alta Pressão Hidrostática (APH) se apresenta como uma tecnologia de grande interesse. Trata-se de um processo não térmico (não há aquecimento dos alimentos) capaz de aumentar a vida útil através da inativação de enzimas e eliminação de microrganismos, e preservar importantes atributos de frescor e qualidade nutricional similares aos observados nos produtos frescos, não processados (BALASUBRAMANIAM, FARKAS e TUREK, 2008). Recentes revisões têm demonstrado os benefícios e as vantagens do processamento de alimentos por APH (BUCKOW, SIKES e TUME, 2013; TRUONG et al., 2015).

O processamento de peixe por APH ocorre industrialmente em todo o mundo, representando cerca de 5 % de todo alimento pressurizado (HUANG et al., 2017). O crescimento desse mercado se deve à eficiência desse processo em aumentar a vida de prateleira desses produtos (YAGIZ et al., 2007, 2009) através da inativação de microrganismos e alteração da atividade enzimática autolítica *post mortem*.

Compostos nitrogenados, como TMA e N-BVT, são tradicionalmente utilizados como indicadores de qualidade de peixes durante armazenamento. O aumento da concentração de TMA está relacionada à atividade de microrganismos que metabolizam TMA-O (óxido de trimetilamina – osmorregulador presente em diversos peixes marinhos), através da atividade das enzimas N-óxido de trimelitamina dimetilase e N-óxido de trimelitamina redutase, produzindo TMA e outros compostos de odor desagradável, de peixe deteriorado (GHALY et al., 2010; LEE e PARK, 2016). Já N-BVT inclui diversos compostos nitrogenados não proteicos de baixo peso molecular, como TMA, DMA, amônia, nucleotídeos e aminoácidos sulfurosos, e o aumento do seu teor está relacionado à atividade autolítica e microbiológica (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011).

As sucessivas degradações do ATP ($ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow HxR \rightarrow Hx$) são resultado da atividade de enzimas endógenas ou microbiana e, logo, podem ser utilizadas como indicadores de frescor ou deterioração. Li et al. (2017a) relacionaram as enzimas adenosina monofosfatase deaminase (AMPD), fosfatase ácida (ACP) e nucleosidase fosforilase à degradação dos nucleotídeos, tendo observado, em carpas, que a degradação até IMP é predominantemente autolítica (AMPD) e, posteriormente, até HxR e Hx, é mais influenciada por atividade microbiológica (ACP + nucleosidase fosforilase). É esperado que as concentrações de ATP, ADP e AMP decresçam rapidamente nos primeiros instantes *post mortem*, e as concentrações de HxR e Hx aumentem mais tardiamente durante o armazenamento. O acúmulo de IMP, evento benéfico para qualidade pelo potencial de melhoria no sabor e aroma, ocorre de acordo com equilíbrio entre formação ($ATP \rightarrow IMP$) e degradação ($IMP \rightarrow HxR \rightarrow Hx$). O acúmulo de Hx (sabor amargo) e HxR (sabor insípido) ocorre em estágio tardio de armazenamento, indicando deterioração avançada (ANDRADE et al., 2014; LI et al., 2017a).

Diante disso, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito da APH na formação de compostos nitrogenados e degradação de nucleotídeos sem filé de sardinha brasileiro, um dos peixes mais capturados no mundo e de grande importância para o mercado brasileiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletados 40 kg de sardinhas frescas de um mesmo lote, capturado a menos de 24 horas antes da coleta, no momento do desembarque no porto de Angra dos Reis (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os peixes foram transportados em caixas de isopor contendo gelo (gelo/peixe 2:1) e mantidos nessa condição por 16 h até os procedimentos de preparo e pressurização. Foram selecionadas 60 sardinhas (3 unidades por tratamento por tempo de armazenamento – 3 x 5 x 4) de peso individual entre 90 e 100 g com aspectos de frescor preservados (firmeza, coloração, integridade e aroma característicos).

As sardinhas selecionadas foram lavadas (agitação em tanque com água e gelo por aproximadamente 5 min) e submetidas, posteriormente, à remoção manual da cabeça (altura da brânquia), cauda (altura do orifício excretor), vísceras, escamas e espinha. No dia da pressurização (dia 0), todas as unidades, incluindo os controles, foram embalados individualmente em sacos de polietileno selados a vácuo em posição natural do peixe (“não espalmada”, filés dobrados sobre as cavidades abdominais). Imediatamente após o acondicionamento nas embalagens (controle) ou após os ciclos de pressurização, todas as mostras foram acondicionadas em câmara de refrigeração e mantidas $5 \pm 2^\circ\text{C}$ por 21 dias, com retiradas nos dias 1, 7, 14 e 21 para análises.

2.2 Pressurização

Pressurizações foram realizadas em equipamento piloto de Alta Pressão Hidrostática (Stansted Fluid Power S-FL-850-9-W), que possui capacidade de pressurização entre 100 e 900 MPa com controle de temperatura entre 0 e 80°C . O equipamento possui câmara de pressurização cilíndrica de aço inox (diâmetro 4 cm, 30 cm de altura e volume útil de 345 ml) e foi operado com solução alcoólica (70 %) como fluido de pressurização. O equipamento promove a pressurização através de bomba hidráulica que desloca um pistão para o interior do cilindro, promovendo taxa de pressurização de $7 \text{ MPa}\cdot\text{s}^{-1}$, e exibe despressurização instantânea após o alívio da pressão ao final do ciclo.

Muito embora a tecnologia de APH possibilite processamento de alimentos até 1000 MPa, usualmente a maioria dos processos utilizam níveis de pressão entre 100 e 600 MPa por período de tempo variável entre poucos segundos até 60 min. Resultados preliminares sugeriram que os tratamentos 300 MPa / 0 min, 400 MPa / 0 min, 200 MPa / 15 min e 300 MPa / 15 min exibiram potencial de promover estabilidade físico química, com baixa ocorrência de efeitos adversos. Dessa forma, na presente pesquisa, esses mesmos níveis de APH foram avaliados quanto à capacidade de estabilizar formação de compostos nitrogenados (aminas biogênicas, trimetilamina e nitrogênio básico volátil total) e a degradação de nucleotídeos.

2.3 Análises

Todas as análises foram realizadas em triplicata experimental (três sardinhas – N=3) com pelo menos três repetições analíticas por amostra (triplicata analítica). Cada amostra individual (sardinha) recebeu avaliação de todas as análises descritas a seguir.

2.3.1 Caracterização da contaminação inicial

Os filés de sardinha foram caracterizados quanto a contagem microbiana no início do experimento (dia 0). Aliquotas de 25 g foram coletadas de cada filé de sardinha e homogeneizadas com 225 ml de água peptonada (0,1 %) estéril por 60 segundos e, posteriormente, diluídas até 10^{-6} . Aliquotas (20 μ L) foram transferidas, com auxílio de micropipeta, para superfície seca dos ágaros: Man Rosaga and Sharp para enumeração de bactérias ácido lácticas totais, eosina azul de metileno para enumeração de *Enterobacteriaceae*, e ágar padrão para contagem para enumeração de contagem total de bactérias mesofílicas e contagem total de psicrotóxicos. As placas para enumeração de psicrotóxicos foram incubadas a 7 °C por 10 dias e as demais a 36 °C por 48 horas.

2.3.2 Trimetilamina (TMA) e nitrogênio básico volátil total (N-BVT)

Trimetilamina (TMA) e nitrogênio básico volátil total (N-BVT) foram determinados por destilação através de aparato de microdifusão de Conway (CONWAY e BYRNE, 1933). Aliquota de 5 g de fração muscular macerada sem pele foi homogeneizada com 10 ml de ácido tricloroacético (TCA, 5 %) e, posteriormente, filtrada. Após neutralização do filtrado com solução saturada de carbonato de potássio, os compostos N-BVT foram absorvidos pelo ácido bórico e titulados com ácido clorídrico (0,01 M). TMA foi determinado pelo mesmo procedimento, mas com adição de formaldeído à amostra. Os resultados foram expressos em mg / 100 g de amostra.

2.3.3 Degradação de nucleotídeos e valor K

A quantificação de ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato), IMP (inosina trifosfato), HxR (inosina), e Hx (hipoxantina) foi realizada de acordo com (ANDRADE et al., 2012). Extração foi realizada com homogeneização de 50 mg de amostra (porção muscular macerada e sem pele) com 1 ml de ácido perclórico (8 %) em ultrassom por 10 min, seguido de neutralização com 200 μ l de KOH 6 M e centrifugação a 6300g x 3 min. Sobrenadante foi recolhido e armazenado (- 18 °C) para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em equipamento Waters® e2695, equipado com detector UV (2998 DAF – Detector de Arranjo de Fotodiodos) com coluna C18 (Therms® BDS Hypersil, 2,4 μ m, 100 x 4,6 mm). As injeções foram alternadas com 15 min de equilíbrio (100 % Fase A) e realizadas com composição de fases, gradiente de eluição e fluxos conforme apresentados na Tabela 1. Tampão fosfato foi previamente filtrado em membrana de acetato (0,45 μ m – Schleicher & Schuell®) e pré-coluna C18 (LiChroCART®, 5 μ m, 250 x 4 mm, fluxo 1,0 ml.min⁻¹). Volume de injeção foi de 2 μ l e coluna mantida a 30 °C e injetor a 20 °C. Leitura de absorvância foi realizada a 254 nm. Curva de calibração foi feita a partir da diluição de soluções dos padrões analíticos (\pm 3 mg) de ATP, ADP, AMP, IMP, HxR, and Hx ($R^2 > 99,99$ %).

Valor K foi calculado pela proporção das concentrações individuais dos nucleotídeos (μ mol.g⁻¹) através da seguinte equação (LI et al., 2017a):

$$K(\%) = \left[\frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \right] / 100$$

Equação 1 – Fórmula para cálculo do valor K

Tabela 1 – Composição e fluxo de injeção da fase móvel para quantificação de nucleotídeos em filé de sardinha brasileira.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase (C)	Fluxo (ml.min ⁻¹)
0,00	100,0	0,0	0,0	1,0
4,00	95,0	5,0	0,0	1,0
5,50	87,5	12,5	0,0	1,0
5,60	0,0	12,5	87,5	1,0
6,00	0,0	60,0	40,0	1,0
9,00	0,0	60,0	40,0	1,0
9,10	0,0	0,0	100,0	1,0
9,25	0,0	0,0	100,0	1,0
9,50	100,0	0,0	0,0	1,0
15,0	100,0	0,0	0,0	1,0

Fase A: tampão fosfato (0,04 M KH₂PO₄ e 0,06 M K₂HPO₄ – pH 6,8)

Fase B: acetonitrila

Fase C: água

2.4 Estatística

Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicatas, e os resultados avaliados estatisticamente em software XLSTAT versão 2016.02.28451 (Addinsoft, Paris, França). Os efeitos dos tratamentos (APH) e do período de armazenamento foram avaliados separadamente através de análises de variância independentes (ANOVA, one-way). Efeitos da APH foram avaliados através da comparação entre os diferentes tratamentos de APH (teste de Tukey), e entre cada tratamento de APH e o controle armazenado pelo mesmo período (teste de Dunnet). Efeito do tempo de armazenamento foi avaliado através da comparação entre os períodos de armazenamento (1, 7, 14 e 21 dias) dentro do controle e de cada tratamento (teste de Tukey).

Adicionalmente, considerando que a APH exibe potencial para preservar aspectos de qualidade similares aos dos alimentos frescos não processados, filé de sardinha com essas características (Controle ^{Dia0} – amostra fresca, não pressurizada e não armazenada), foi utilizado como referência para comparação com cada uma das parcelas experimentais (tratamento vs tempo de armazenamento) através do teste de Dunnet. Os resultados destacados (sombra em cinza) expressam preservação ou aumento da qualidade em relação a essa referência, e, dessa forma, na análise de IMP expressam médias iguais ou superiores ao controle, e nas demais análises (TMA, N-BVT, ATP, ADP, AMP, HxR, Hx, Valor K) expressam médias iguais ou inferiores ao controle.

Em todas as avaliações foi adotado $p = 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização da contaminação Inicial

A contaminação inicial de peixes frescos é oriunda do ambiente aquático do local da captura e da posterior manipulação, e seu desenvolvimento *post mortem* é a causa principal de deterioração (GRAM e HUSS, 1996). A APH é uma tecnologia eficiente na eliminação de microrganismos e, conseqüentemente, pode contribuir para aumento da vida útil de peixes

prevenindo formação de compostos indesejáveis de seu metabolismo (HUGHES et al., 2016). Os efeitos sobre os microrganismos são decorrentes da compressão seguida de expansão dos fluidos intracelulares, alterações nas membranas celulares, morfológicas, e na síntese de DNA, além da desnaturação de proteínas e modificação da atividade de enzimas (MURCHIE et al., 2005a; PATTERSON, 2005)

As contagens iniciais de bactérias nas amostras são apresentadas na Tabela 2. No início do armazenamento (dia 0) não foram observadas contagens de bactérias do ácido láctico (BAL) ($< 1,6 \log \text{UFC.g}^{-1}$) e psicrotróficas ($< 1,6 \log \text{UFC.g}^{-1}$), e verificadas baixas contagens de enterobactérias ($1,79 \log \text{UFC.g}^{-1}$) e bactérias totais ($3,32 \log \text{UFC.g}^{-1}$) nas sardinhas controle. Enterobactérias exibiram sensibilidade a todos aos níveis de APH, exibindo contagens inferiores a $1,60 \log \text{UFC.g}^{-1}$ independente da intensidade dos tratamentos. Os mesófilos totais também exibiram redução da contagem em relação ao controle em todos os tratamentos de APH, mas os de mais longa duração (15 min) promoveram reduções superiores aos de curta duração (0 min).

Tabela 2 – Contaminação inicial (dia 0) de filé de sardinha brasileira controle e tratadas por APH

Tratamento	Bactérias ácido lácticas totais	Classe de bactérias ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)		
		<i>Enterobacteriaceae</i>	Psicrotróficas	Bactérias mesófilicas
Controle	$<1,60$	1,79	$<1,60$	3,32
300 MPa / 0 min	$<1,60$	$<1,60$	$<1,60$	2,41
400 MPa / 0 min	$<1,60$	$<1,60$	$<1,60$	1,80
200 MPa / 15 min	$<1,60$	$<1,60$	$<1,60$	$<1,60$
300 MPa / 15 min	$<1,60$	$<1,60$	$<1,60$	$<1,60$

* Contagem “ $<1,60$ ” significa que exibiram contagem inferior a $1,60 \log \text{UFC.g}^{-1}$, limite mínimo de quantificação do método utilizado.

^(c) Média inferior ($<$) ao controle (mesma coluna);

^{a,b,c} Expressam diferença entre níveis de APH (mesma coluna);

A contaminação inicial identificada é inferior ao esperado para peixe e fruto do mar fresco. Sardinha brasileira coletada em entreposto de pescado exibiu no ato da coleta $4,61 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de bactérias totais e, após 2 dias a 0°C , $3,8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de enterobactérias (ANDRADE et al., 2012). No entanto, outra pesquisa com sardinha encontrou $2 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de contagem total (TEODORO, ANDRADE e MANO, 2007), contaminação mais próxima da presente pesquisa. *Sardinella gibosa* também exibiu $10^2 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de mesófilos totais, e apenas 4 NMP.g^{-1} de coliformes (NUWANTHI et al., 2016). Já filé de *Sardina pilchardus* exibiu $3,8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de mesófilos totais, $1,8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de BAL, e enterobactérias inferior a $1 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (STAMATIS e ARKOUELOS, 2007).

Diante da ausência de pesquisas sobre aplicação de APH em sardinhas, resultados com outros peixes e frutos do mar são discutidos à seguir. Atum, exibiu 10^2 UFC.g^{-1} de mesófilos totais e psicrotróficos, e, após aplicação de $310 \text{ MPa} / 6 \text{ min}$, a contagem de ambos se manteve estável por até 25 dias a 4°C , enquanto o controle alcançou contagem superior a $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de mesófilos e $5 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de psicrotróficos (RAMIREZ-SUAREZ e MORRISSEY, 2006). Mesófilos totais em abalone (contagem inicial de $2 \log \text{UFC.g}^{-1}$) não exibiram redução significativa imediatamente após tratamentos de $100 \text{ MPa} / 5$ ou 10 min e

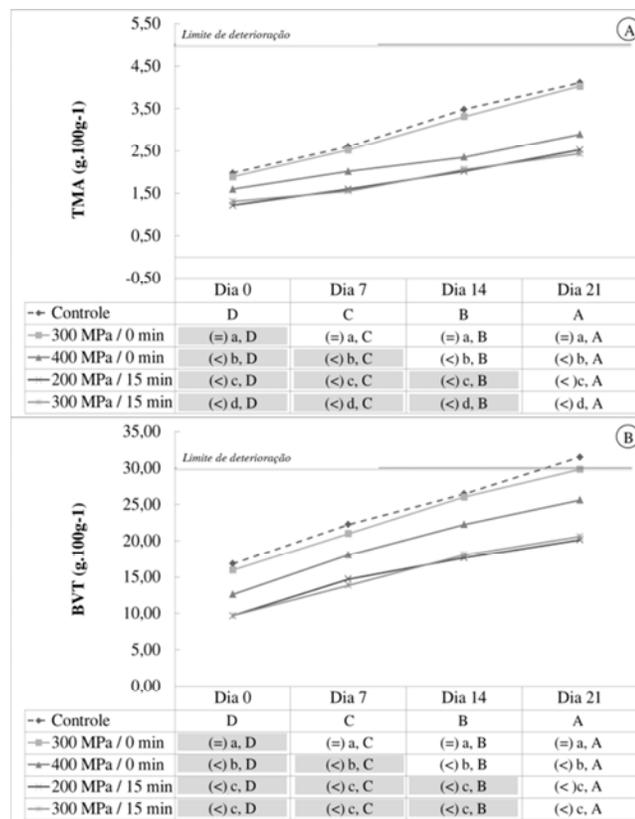
300 MPa / 5 ou 10 min, mas dos 7 aos 35 dias a 2 °C os tratamentos a 300 MPa promoveram contagens inferiores ao controle entre 2 e 4 log UFC.g⁻¹ (HUGHES et al., 2016). Já abalone fresco exibindo 2,3 log UFC.g⁻¹ de bactérias totais teve essa contagem reduzida para indetectável após 400 MPa / 3 min (JO et al., 2014). Por outro lado, essa mesma classe de bactérias foi maior em sea bass fresco (< 5 log UFC.g⁻¹) e mais resistente à APH, exibindo estabilidade a 100 MPa / 0 ou 5 min, e pequena redução para entre 3,96 e 4,40 log UFC.g⁻¹ a 250 ou 400 MPa / 0 ou 5 min (TEIXEIRA et al., 2014a). *Gilthead sea bream* exibiu contagens iniciais de bactérias totais e de psicrotóxicos de 3,82 x 10³ UFC.g⁻¹ e 9,2 x 10² UFC.g⁻¹, respectivamente, e ambos exibiram expressiva redução quando expostos a 200, 300 e 400 MPa / 10 min (CAMPUS et al., 2010). Bactérias do ácido lático foram detectadas inicialmente em merluza (3 log UFC.g⁻¹) e exibiram redução máxima de 1 log quando pressurizada a 200, 300 ou 400 MPa / 15 min / 7 ou 40 °C (HURTADO et al., 2001).

Calanche et al. (2013) avaliaram sardinha e salmão em linha de processo industrial (indústria certificada quando às boas práticas de fabricação), e observaram que no início do processo (peixes inteiros) ambos exibiram maiores contagens de bactérias totais e enterobactérias do que no final (produto acabado em forma filés). As amostras de sardinha exibiram redução de 5 log UFC.g⁻¹ entre início e fim do processamento. Esse resultado demonstra a influência da manipulação na contagem desses microrganismos, sugerindo que práticas adequadas podem contribuir para redução da contaminação. Na presente pesquisa, as baixas contagens observadas podem estar, da mesma maneira, relacionadas aos procedimentos de manipulação desde a coleta até a realização das análises. As amostras foram coletadas no ato do desembarque, em lote recém-capturado que exibia visualmente boa proporção de gelo:peixe e grande proporção de sardinhas inteiras íntegras (sem buracos nas peles ou rompimento de barriga), o que contribui para preservação da esterilidade do tecido muscular (JAY, LOESSNER e GOLDEN, 2005). Da coleta das amostras ao processamento por APH, as amostras foram mantidas em gelo de água potável em abundância, sempre que não estivessem sendo manipuladas, além de terem sido lavadas previamente à evisceração com volume de água e gelo superior a duas vezes o de peixe. O preparo do filé (remoção de cabeça, cauda, vísceras e escamas) foi realizado com água potável corrente continuamente, e com higienização frequente dos utensílios utilizados. As vísceras foram cuidadosamente removidas manualmente, após abertura do abdômen com auxílio de tesoura afiada, sem promover rompimento das mesmas. Logo, as baixas contagens iniciais encontradas podem estar relacionadas a essas práticas de manipulação.

3.2 Trimetilamina (TMA) e nitrogênio básico volátil total (N-BVT)

Concentrações a partir de 5,0 mg.g⁻¹ de TMA e 30 mg.g⁻¹ de N-BVT, são utilizados como indicadores de deterioração em diferentes peixes (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016). Na presente pesquisa, TMA e N-BVT ficaram inferiores a esses limites (Figura 1). Concentrações limítrofes foram observadas apenas no 21º dia, no controle (4,12 ± 12 mg.g⁻¹ de TMA e 31,50 ± 2,11 mg.g⁻¹ de BVT) e 300 MPa / 0 min (4,03 ± 0,16 mg.g⁻¹ de TMA e 29,82 mg.g⁻¹ de BVT). Aumento de TMA e N-BVT em sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) e *Sardinella* spp. durante o armazenamento refrigerado são frequentemente relatados (GÖKODLU, ÖZDEN e ERKAN, 1998; ÖZOGUL, POLAT e ÖZOGUL, 2004; ERKAN e OZKAN, 2008; KILINC, CAKLI e TOLASA, 2008; CHATZIKYRIAKIDOU e KATSANIDIS, 2011; ANDRADE et al., 2012). As concentrações iniciais de TMA e N-BVT estão de acordo com as encontradas em sardinhas inteiras por Andrade et al. (2012), ainda que esses autores tenham observado aumento mais acentuado

durante o armazenamento (em gelo, 0 ± 2 °C). Essa maior taxa de formação dos compostos ao longo do armazenamento pode estar relacionada à maior presença de bactérias mesófilas ($4,61 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) e psicotróficas ($4,25 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) encontradas. Adicionalmente, taxa de formação menos intensa observada na presente pesquisa pode estar relacionado à filetagem do peixe, que minimiza atividade autolítica pela redução da quantidade de enzimas removida nas vísceras (ERKAN; OZKAN, 2008; GHALY et al., 2010). Além disso, o vácuo durante o armazenamento também inibe a formação de TMA e N-BVT (ÖZOGUL, POLAT e ÖZOGUL, 2004; RODRIGUES et al., 2016; MANJU et al., 2007; TEODORO, ANDRADE e MANO, 2007). O frescor das amostras no ato da coleta (amostras frescas, recém-capturadas e desembarcadas no porto – K valor < 20 %, conforme sessão 3.3) e práticas controladas desde a coleta até as análises (uso abundante de gelo e água potável e remoção cuidadosa de vísceras, conforme sessão 3.1) também podem contribuir para baixa formação de N-BVT e TMA durante o armazenamento (PEREIRA e TENUTA-FILHO, 2005).



(<), (=) Média inferior

(<) ou igual (=) ao

controle armazenado pelo mesmo período (mesma coluna);

^{a,b,c} Expressam diferença entre níveis de APH no mesmo dia de armazenamento (mesma coluna);

^{A,B,C,D} Expressam diferença entre dia de armazenamento no mesmo tratamento (mesma linha);

Sombras em cinza expressam média significativamente igual ou inferior ao controle fresco não pressurizado e não armazenado (controle – dia 0).

Significância de 5 % em todas as comparações.

Figura 1 – Trimetilamina (TMA) e nitrogênio básico volátil total (N-BVT) de carne de filé de sardinha controle (não pressurizada) ou tratada por APH durante refrigeração a 5 ± 2 °C

A APH inibiu a formação de TMA e N-BVT nos filés de sardinha. Apesar do aumento nas concentrações durante os 21 dias, os filés de sardinha tratados por 200 MPa / 15 min e 300 MPa / 15 min preservaram as concentrações de TMA e N-BVT similares ou inferiores ao controle fresco (referência fresca, não pressurizada e não armazenada) até o 14º dia. Já os tratamentos 400 MPa / 0 min, 200 MPa / 15 min e 300 MPa / 15 min preservaram as concentrações de TMA e BVT inferiores aos controles armazenados pelo mesmo período até os 21 dias. Considerando que concentrações de TMA e N-BVT são importantes e tradicionais indicadores de deterioração de pescados (concentrações elevadas), esse resultado evidencia relevante capacidade da APH em promover aumento de vida de prateleira de sardinha.

A inibição foi influenciada pelos níveis de pressão e tempo de processo da APH. Durante todo o armazenamento, tratamentos mais intensos em 15 min (300 MPa / 15 min vs 300 MPa / 0 min) ou superiores em 100 MPa (400 MPa / 0 min vs 300 MPa / 0 min e 300 MPa / 15 min vs 200 MPa / 15 min) proporcionaram menores concentrações de TMA. Efeito sobre BVT foi similar, exceto pela similaridade entre 300 MPa / 15 min e 200 MPa / 15 min. Entre os tratamentos, 400 MPa / 0 min e 300 MPa / 15 min, o segundo exibiu maior intensidade ao proporcionar menores concentrações de N-BVT e TMA. Já entre 300 MPa / 0 min com 200 MPa / 15 min, o primeiro mostrou-se mais brando por razão análoga.

As diferenças entre os tratamentos detectadas no dia 0 foram preservadas até o 21º dia. No entanto, diferenças nas taxas de formação ($\mu = \text{mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) de TMA e N-BVT ocorreram. Os tratamentos mais intensos, que exibiram menores concentrações de TMA durante os 21 dias, exibiram taxas de formação similares entre si ($\mu_{300\text{MPa}/15\text{min}} = 0,062 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; $\mu_{200\text{MPa}/15\text{min}} = 0,056 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; $\mu_{400\text{MPa}/0\text{min}} = 0,061 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e menores que o tratamento mais brando ($\mu_{300\text{MPa}/0\text{min}} = 0,103 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e o controle ($\mu_{\text{Controle}} = 0,104 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Comportamento semelhante ocorreu na formação de BVT, à exceção de 400 MPa / 0 min, que exibiu taxa intermediária ($\mu_{400\text{MPa}/0\text{min}} = 0,618 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) entre os tratamentos mais intensos ($\mu_{300\text{MPa}/15\text{min}} = 0,528 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; $\mu_{200\text{MPa}/15\text{min}} = 0,492 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), e o mais brando ($\mu_{300\text{MPa}/0\text{min}} = 0,666 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e o controle ($\mu_{\text{Controle}} = 0,690 \text{ mg.g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$). Esses resultados podem estar relacionados às menores contagens de microrganismos proporcionadas pelos tratamentos mais intensos. Adicionalmente, os tratamentos mais intensos podem ter causado injúria subletal nos microrganismos e/ou desnaturação parcial das enzimas, conferindo a ambos menor atividade durante o armazenamento.

Devido a escassez de pesquisas com peixes de características similares à sardinha (pequenos, fibras vermelha e elevado teor de gordura), resultados dos efeitos da APH em outros peixes serão apresentados. Limites de TMA (5 mg.g^{-1}) e N-TVB (35 mg.g^{-1}) não foram ultrapassados por hadock pressurizado (200 MPa / 5 min / 5 °C ou 400 MPa / 5 min / 15 °C) até o 29 dias / 4 °C, diferentemente do controle não pressurizado que superou esses valores com 5 dias (ALPAS e AKHAN, 2012). Merluza pressurizada (3 pulsos de 200 ou 400 MPa / 5 min) também exibiu menor concentração de TMA que o controle não pressurizado por até 50 dias / 2-3 °C (HURTADO, MONTERO e BORDERÍAS, 2000). Hadock e arenque tratados por APH (200, 250 ou 300 MPa / 1 ou 3 min) exibiram menor TMA e BVT que o controle por até 14 dias / 2°C, ainda que os níveis de pressão e de tempo não tenham influenciado (KARIM et al., 2011). Níveis de pressão e tempo similares a esses últimos, mas em temperaturas variáveis de tratamento por APH (220, 250 e 300 MPa / 5 ou 10 min / 7, 15 ou 25 °C) também não influenciaram a concentração de TMA em cavala após o processo, ainda que amostras tratadas a 330 MPa / 10 min / 7°C e 220, 250 ou 320 MPa / 10 min / 25 °C

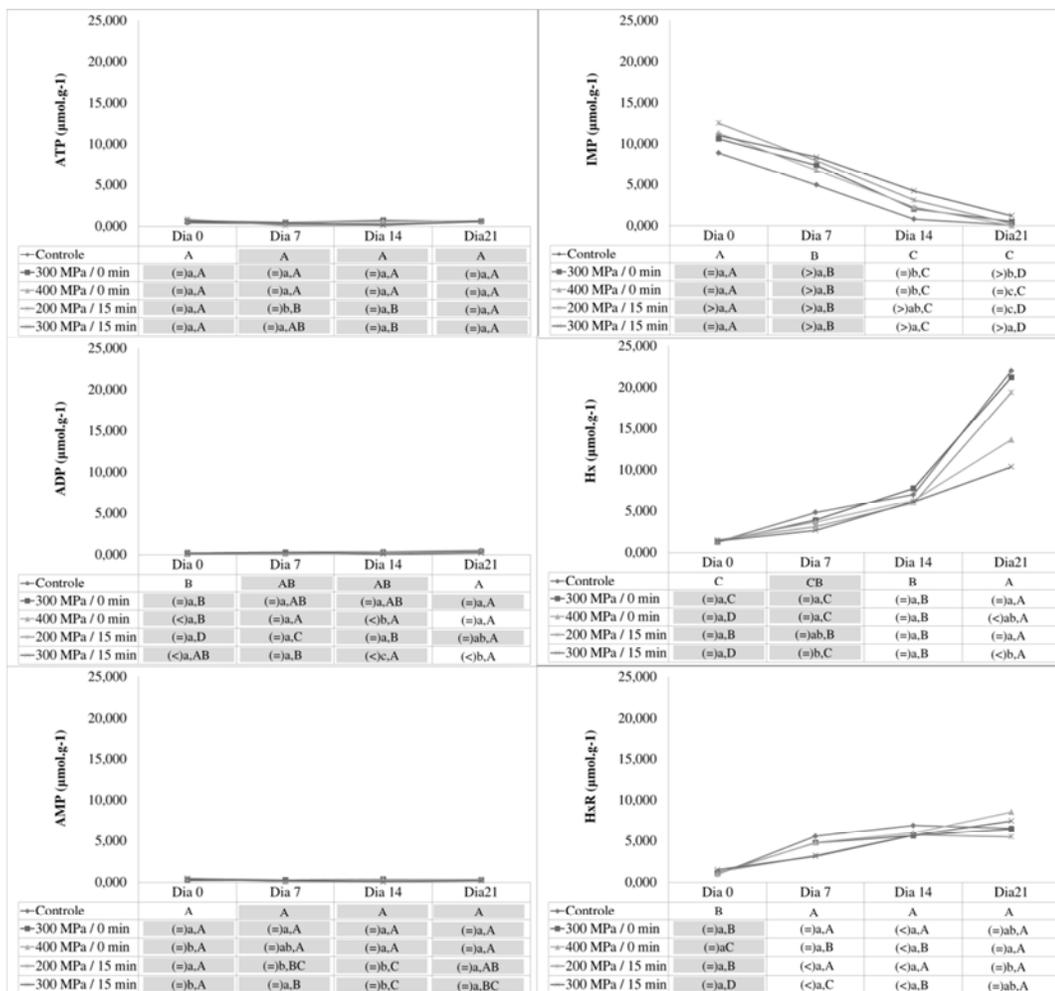
tenham exibido concentrações inferiores ao controle (ERKAN, ÜRETENER e ALPAS, 2011). Já robalo pressurizado (250 ou 400 MPa / 5 min) não exibiu efeito da APH sobre concentração de TMA e BVT durante 18 dias a 1,9 °C (TEIXEIRA et al., 2014b). Adicionalmente, a aplicação de APH em frutos do mar também exibe potencial para minimizar a concentração de TMA e TVB, como observado em abalone (JO et al., 2014; HUGHES et al., 2016), camarão *white prawn* (BINDU et al., 2013) e camarão (KAUR et al., 2013), e lula (ZHANG et al., 2015).

Todos os resultados dessas pesquisas relacionam ou atribuem as menores concentrações de TMA e N-BVT à redução da atividade microbológica e enzimática causada pela APH. A não detecção de efeito da APH sobre essas concentrações pode estar relacionada a níveis de tempo e/ou pressão insuficientes para afetar essas atividades. Adicionalmente, considerando que a APH não é capaz de eliminar TMA e BVT previamente formados, fica evidente que o potencial de inibição só pode ser detectado e avaliado quando ocorre formação desses compostos nas amostras não expostas à APH.

3.3 Degradação de Nucleotídeos e Valor K

As sucessivas degradações do ATP ($ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow HxR \rightarrow Hx$) são resultado da atividade de enzimas endógenas ou microbiana e, logo, podem ser utilizadas como indicadores de frescor ou deterioração. Li et al. (2017) relacionaram as enzimas adenosina monofosfatase deaminase (AMPD), fosfatase ácida (ACP) e nucleosidase fosforilase à degradação dos nucleotídeos, tendo observado, em carpas, que a degradação até IMP é predominantemente autolítica (AMPD) e, posteriormente, até HxR e Hx, é mais influenciada por atividade microbológica (ACP + nucleosidase fosforilase). É esperado que as concentrações de ATP, ADP e AMP decresçam rapidamente nos primeiros instantes *post mortem*, e as concentrações de HxR e Hx aumentem mais tardiamente durante o armazenamento. O acúmulo de IMP, evento benéfico para qualidade pelo potencial de melhoria no sabor e aroma, ocorre de acordo com equilíbrio entre formação ($ATP \rightarrow IMP$) e degradação ($IMP \rightarrow HxR \rightarrow Hx$). O acúmulo de Hx (sabor amargo) e HxR (sabor insípido) ocorre em estágio tardio de armazenamento, indicando deterioração avançada (ANDRADE et al., 2014; LI et al., 2017b).

As concentrações dos nucleotídeos em sardinha controle ou pressurizada, durante o armazenamento são apresentadas na Figura 2. Os nucleotídeos ATP, ADP e AMP exibiram valores muito reduzidos durante todo o período de avaliação em todas as amostras, controle e tratadas por APH ($< 0,850 \mu\text{mol.g}^{-1}$). As médias flutuaram em torno dos valores iniciais, não diferindo ou exibindo pontualmente concentrações ligeiramente inferiores à amostra controle fresca (referência fresca, não pressurizada e não armazenada). Não foi possível detectar relação clara ou tendência em relação ao tempo de armazenamento ou parâmetros de APH. Baixas concentrações desses nucleotídeos podem ser atribuídas à degradação prévia desses compostos, entre o momento da pesca, ainda no mar (início das alterações *post mortem*), e o processamento (TEIXEIRA et al., 2014b; LI et al., 2017a). Carpa refrigerada (11 dias, 4°C) exibiu redução drástica desses nucleotídeos nas primeiras 24 horas *post mortem*, com posterior flutuação das concentrações até o 11º dia (LI et al., 2017b). Comportamentos semelhantes foram observados em arraia armazenada em gelo por 18 dias, sendo os baixos valores iniciais atribuídos ao estresse pela pesca por rede (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011). Em robalo armazenado a 1,9 °C / 18 dias, as concentrações desses nucleotídeos foram também muito reduzidas e, por isso, desconsideradas na determinação do frescor (cálculo do



(<), (=), (>) Média inferior (<), igual (=) ou superior (>) ao controle armazenado pelo mesmo período (mesma coluna);
 a,b,c Expressam diferença entre níveis de APH no mesmo dia de armazenamento (mesma coluna);
 A,B,C,D Expressam diferença entre dia de armazenamento no mesmo tratamento (mesma linha);
 Sombras em cinza nos gráficos de ATP, ADP, AMP, HxR e Hx expressam média significativamente igual ou inferior ao controle fresco não pressurizado e não armazenado (controle no dia 0).
 Sombras em cinza nos gráficos de IMP expressam média significativamente igual ou superior ao controle fresco não pressurizado e não armazenado (controle no dia 0).
 Significância de 5 % em todas as comparações.

Figura 2 – Concentração (μmol.g⁻¹) de ATP, ADP, AMP, IMP, HxR e Hx em filé de sardinha controle ou pressurizado durante armazenamento por 21 dias a 5 ± 2 °C.

valor K) (TEIXEIRA et al., 2014b). A não detecção de efeito da APH sobre a concentração desses compostos pode ter ocorrido pelo processamento em momento em cujas reservas desses nucleotídeos já se encontravam muito reduzidas.

Apesar de ter havido redução na concentração de IMP ao longo de todo o armazenamento, esse foi o nucleotídeo predominante em todas as amostras até o 7º dia, e sua degradação foi inibida pela APH. Enquanto o controle degradou 44,4 % entre o dia 0 e dia 7, todos os tratamentos de APH preservaram as concentrações de IMP similares às observadas

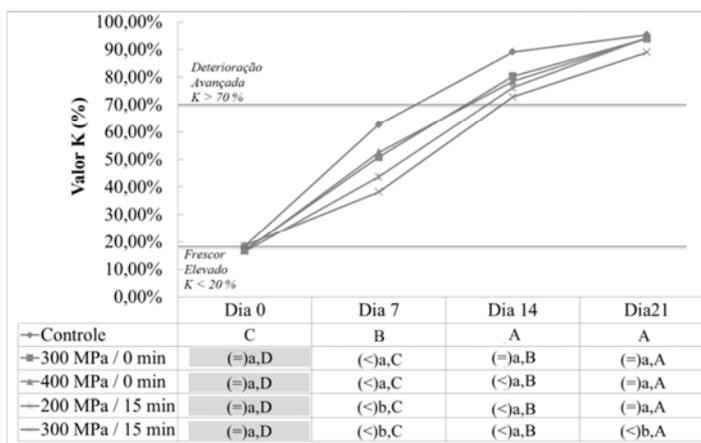
na amostra fresca (referência fresca, não pressurizada e não armazenada) pelo mesmo período. Do 7° ao 21° dia, sardinhas tratadas por 300 MPa / 15 min exibiram IMP superior aos controles armazenados pelo mesmo período. Mesmo comportamento foi observado em 200 MPa / 15 min entre o 7° e 14° dia. Esses resultados estão de acordo com aqueles observados em tilápia armazenada por até 12 horas após ser pressurizada a 50, 100, 200 ou 300 MPa (KO e HSU, 2001). O efeito da APH pode estar relacionado à redução da atividade de enzimas que degradam esse nucleotídeo, como a fosfatase ácida. Essa enzima, em sea bass, exibiu atividade similar ao controle quando pressurizada a 100 MPa / 0, 5, 10 ou 30 min, mas exibiu redução a partir de 250 MPa / 0 min (250 MPa / 0 ou 30 min ou 400 MPa / 0, 5, 10 ou 30 min (TEIXEIRA et al., 2013).

HxR e Hx estavam presentes nas sardinhas no início do armazenamento em baixa concentração ($\approx 1 \mu\text{mol.g}^{-1}$), o que indica elevado frescor das amostras utilizadas. Como esperado, houve aumento desses teores durante o armazenamento, mas em menor intensidade nas amostras tratadas por APH. Esse efeito de inibição é coerente com a tendência de retenção da concentração de IMP ($r_{\text{HxR/IMP}} = -0,86$; $r_{\text{Hx/IMP}} = -0,76 - p \leq 0,01$). Até o 7° dia, a concentração de Hx dos filés de sardinhas tratadas por APH mantiveram-se estáveis (similares ao controle fresco – a referência fresca, não pressurizada e não armazenada), independente do nível de APH. O aumento de HxR foi minimizado no 7° dia pelos tratamentos mais longos (200 MPa / 15 min e 300 MPa / 15 min), e no 14° dia por todos os tratamentos de APH.

Aumento na concentração de HxR e Hx durante armazenamento de peixe refrigerado foi observado em carpa (LI, et al., 2017a), arraia (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011), salmão (AUBOURG et al., 2007) e *mullet* (ANDRADE et al., 2014). São escassos artigos que tenham investigado os efeitos da APH sobre a concentração desses nucleotídeos. Apenas em filés de tilápia foi observado efeito inibitório na produção de Hx e HxR, mas sem tendência clara dos níveis de pressão (50, 100, 200 ou 300 MPa) (KO e HSU, 2001).

Variações nas concentrações dos nucleotídeos são avaliadas em conjunto através do valor K. Esse parâmetro expressa a proporção dos nucleotídeos finais de degradação (HxR e Hx) em relação aos demais, de maneira que “frescor elevado” é sugerido quando representam até 20 % ($K < 20$ %), “frescor moderado” quando representam entre 20 e 50 % ($K = 20 - 50$ %), e “deterioração avançada” quando representam mais de 70 % ($K > 70$ %) dos nucleotídeos (SAITO, ARAI e MATSUYOSHI, 1959). De acordo com essa classificação, as sardinhas utilizadas no experimento (Figura 3) exibiram frescor inicial elevado ($K_{\text{Dia0}} = 16,7 - 18,5$ %). Esse frescor não foi influenciado pela APH logo após aplicação (dia 0), o que evidencia que a APH não exerce efeito diretamente sobre os nucleotídeos.

No período de armazenamento, filés de sardinhas controle e tratados por APH exibiram progressiva perda de frescor, expressa pelo aumento do valor K. No entanto, a APH exibiu tendência de inibir esse comportamento. No dia 7, enquanto o controle exibia frescor próximo do limítrofe entre “moderado” e “deteriorado” ($K_{\text{Controle}}^{\text{Dia7}}: 62,68$ %), a APH preservou frescor “moderado” em todos os tratamentos ($K_{300\text{MPa}/0\text{min}}^{\text{Dia7}}: 50,85$ %; $K_{400\text{MPa}/0\text{min}}^{\text{Dia7}}: 52,53$ %; $K_{200\text{MPa}/15\text{min}}^{\text{Dia7}}: 43,70$ %; $K_{300\text{MPa}/0\text{min}}^{\text{Dia7}}: 38,25$ %). Ainda no 7° dia, observa-se que os tratamentos de longa duração (200 ou 300 MPa a 15 min) promoveram maior atenuação de K (maior frescor) do que os de curta duração (300 ou 400 MPa a 0 min). Já no 14° dia, apesar de mantida mesma tendência, 300 MPa / 0 min passou a exibir K similar ao controle armazenado pelo mesmo período, e os níveis de APH deixaram de influenciar o valor K. Por fim, observa-se no 21° dia que apesar de todos os tratamentos e o controle já



(<), (=), (>) Média inferior (<), igual (=) ou superior (>) ao controle armazenado pelo mesmo período (mesma coluna);
 a,b,c Expressam diferença entre níveis de APH no mesmo dia de armazenamento (mesma coluna);
 A,B,C,D Expressam diferença entre dia de armazenamento no mesmo tratamento (mesma linha);
 Sombras em cinza expressam média significativamente igual ou inferior ao controle fresco não pressurizado e não armazenado (controle no dia 0).
 Significância de 5 % em todas as comparações.

Figura 3 – Valor K de carne de sardinha controle ou pressurizada durante armazenamento por 21 dias a 5 ± 2 °C.

exibirem muito avançado estado de deterioração (valores de K entre 90 e 95 %), 300 MPa / 15 min ainda promoveu valor K inferior ao controle.

Observa-se que o limite de tempo (dias) para que as sardinhas atingissem valor K que as classificasse como em “estado avançado de deterioração” ($K = 70\%$) foi influenciado pela APH. Enquanto o tratamento controle alcançou esse valor mais precocemente (ligeiramente após o 7º dia), a APH postergou o atingimento desse mesmo limiar em extensão proporcional a intensidade desses tratamentos, tendo 300 MPa / 15 min possibilitado alcance desse mesmo valor de K em dia ligeiramente inferior ao 21º. Esse comportamento sugere que a aplicação da APH pode promover aumento da vida de prateleira da sardinha no que se refere à evolução do valor K.

A semelhança entre a maioria dos tratamentos de APH e o controle no 21º dia pode estar mais relacionada ao estado avançado de deterioração do que a perda de efeito da APH. Entre o 14º e 21º dia, o controle já exibiu estado avançado de deterioração (K próximo do valor máximo possível (100 %) – $K_{\text{Controle}}^{14\text{Dias}}$: 89,14 %; $K_{\text{Controle}}^{21\text{Dias}}$: 95,31 %), o que pode ter dificultado a ocorrência de deterioração adicional nesse período ($K_{\text{Controle}}^{14\text{dias}} \approx K_{\text{Controle}}^{21\text{dias}}$). Já as amostras tratadas por APH exibiram maior grau de frescor aos 14 dias ($K_{400\text{ MPa}/0\text{min}}^{14\text{ dias}}$ e $K_{200\text{ MPa}/15\text{min}}^{14\text{ dias}} < K_{\text{Controle}}^{14\text{ Dias}}$), podendo, por isso, exibir maior avanço na deterioração até o dia 21 ($K_{\text{APH}}^{21\text{dias}} > K_{\text{APH}}^{14\text{dias}}$), alcançando patamar similar ao controle armazenado pelo mesmo período. De toda forma, eventual efeito dos tratamentos nesse dia é de menor importância, uma vez que todas as amostras já se encontravam em estado avançado de deterioração ($K > 70\%$). Apenas o tratamento 300 MPa / 15 min preservou valor K inferior ao controle durante todo armazenamento.

Devido a escassez de pesquisas sobre influência da APH sobre o valor K em sardinha, resultados de pesquisas com outros peixes ou frutos do mar serão apresentadas. Abalone pressurizado (100 ou 300 MPa / 5 ou 10 min) exibiu aumento do valor K durante armazenamento (35 dias, 2°C), mas sem efeito significativo da APH (HUGHES et al., 2016). O valor K de salmão também exibiu aumento durante armazenamento (20 dias, 4 °C), mas sem que a APH (137, 170 ou 200 MPa / 30 seg) tenha influenciado esse comportamento (ORTEA et al., 2010). Em ambos os experimentos, os autores sugerem que os níveis de APH (nível de pressão e/ou tempo de processo) podem não ter sido suficientes para inativar enzimas autolíticas, como as ATPases. Corroborando com essa hipótese, Lee et al (2007) observaram, em bovino, que a atividade das enzimas Ca- e Mg- ATPases exibem sensibilidade à APH dependente do nível de pressão ou tempo de processo. As atividades dessas enzimas foram pouco influenciadas por 100 MPa / 5 min, exibiram redução a partir de 200 MPa / 5 min, e a 400 MPa / 5 min reduziu para 10 % a atividade das Ca-ATPases e tornou a atividade das Mg-ATPases indetectável. Corroborando ainda com esse comportamento, 100 MPa / 5 min não influenciou o valor de K em atum, mas 200 ou 300 MPa / 5 min promoveram redução em relação ao controle durante 35 dias a 2 °C. Esses resultados foram atribuídos à desnaturação de enzimas que degradam nucleotídeos pelos níveis mais intensos de APH, como as desfosforilases (KAMALAKANTH et al., 2011). Intensidade similar (250 MPa / 5 min) não influenciou evolução do valor K de sea bass, que exibiu inibição do aumento de K apenas a partir de 400 MPa / 5 min durante 18 dias de armazenamento a 1,9 °C (TEIXEIRA et al., 2014b). Esses resultados sugerem que a APH pode atenuar o aumento do valor K durante o armazenamento de peixes, mas há intensidade mínima de pressão e/ou de tempo necessária para expressão desse efeito.

Por fim, algumas pesquisas determinam o estado de frescor de peixes através do parâmetro K' (ou K₁), que difere de K por negligenciar as concentrações de ATP, ADP e AMP (ANDRADE et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014). Essa aproximação considera que esses nucleotídeos são rapidamente degradados nas primeiras 24 horas *post mortem*, e posteriormente exibem concentração que flutuam próximo de zero, não influenciando expressivamente o parâmetro. Na presente pesquisa, K e K' exibiram elevada e significativa correlação ($r=0,999$; $p \leq 0,01$), sugerindo que a determinação de K' pode substituir satisfatoriamente a de K. Essa substituição representa redução de custo e de tempo na determinação e interpretação dos resultados gerados, contribuindo para otimização da pesquisa.

4. CONCLUSÃO

Foi observada tendência de preservação da qualidade de filé de sardinha brasileira através da aplicação da APH. Durante o armazenamento, a APH exibiu potencial para atenuar a formação de compostos nitrogenados (TMA e N-BVT) e promoveu alterações benéficas no perfil de nucleotídeos, o que conseqüentemente atenuou o aumento do valor K. Esses efeitos foram influenciados pelos níveis de APH, de modo que o tratamento 300 MPa / 0 min foi o que menos influenciou os parâmetros de qualidade, e o tratamento 300 MPa / 15 min causou as principais alterações benéficas.

5. REFERENCIAS

As referências citadas no presente capítulo bem como todas as demais citadas em toda a tese estão apresentadas em sessão única no final da tese

CONCLUSÃO GERAL

Observou-se que os níveis de APH avaliados promoveram distintos efeitos em todos os parâmetros de qualidade avaliados. No entanto, os tratamentos 300 MPa / 0 min, 400 MPa / 0 min, 200 MPa / 15 min, 300 MPa / 15 min promoveram alterações comparáveis ao controle não pressurizado (amostras frescas), em intensidades que os tornam mais semelhantes ao controle que os demais tratamentos. Diante desses resultados, esses tratamentos foram selecionados para avaliações adicionais e ao longo do período de armazenamento dos filés de sardinha em condição de refrigeração (21 dias a 5 °C).

Durante o armazenamento, observou-se que a APH foi capaz de atenuar o amaciamento e prevenir perda de líquido, sem promover expressiva oxidação lipídica ou proteica até, principalmente, 14 dias de armazenamento. Discreto aumento da estabilidade do pH também foi promovido. Adicionalmente, houve inibição de processos relacionados à deterioração das amostras, como a degradação de nucleotídeos e formação de TMA e N-BVT.

Contrariamente, houve alteração dos índices de cor dos filés e em intensidade proporcional aos níveis de APH aplicados, o que pode vir a configurar efeito adverso do processamento em tais variáveis e nesse parâmetro específico de qualidade.

Os resultados obtidos são promissores para continuidade dessa linha de pesquisa, considerando a necessidade de aprofundamento na elucidação dos mecanismos envolvidos e da inter-relação entre os fatores e seus efeitos.

PERSPECTIVAS PARA FUTURAS PESQUISAS

1. Avaliações microbiológicas, especialmente cinéticas de crescimento e inativação pela APH são necessárias para compreender melhor os efeitos a qualidade dos filés de sardinha pressurizados. Adicionalmente, esse tipo de avaliação fornece informações relativas à segurança de sardinhas embaladas a vácuo e pressurizadas, principalmente durante o armazenamento. A atual pesquisa estabeleceu condição de armazenamento em embalagem selada a vácuo, o que torna o meio propício ao crescimento e produção de toxinas pela bactéria *Clostridium botulinum*. Logo, o consumo dessas amostras requer, de forma segura e inquestionável, estabelecimento de processos que garantam sua inocuidade. Sugere-se que pesquisas adicionais, com foco em cinética de crescimento e validação de processo, sejam desenvolvidas. Oportunamente, a validação de processo de APH é um tema extremamente atual, sendo discutido nos principais eventos mundiais sobre processamento de alimentos por Alta Pressão Hidrostática.
2. As alterações causadas pela APH e apontadas nessa tese são frutos de comparações estatísticas com amostras frescas não pressurizadas. Não foi avaliado, e não há consistência de informação na literatura, o quanto esses efeitos são percebidos e influenciam a opinião de consumidores. É indispensável que esses efeitos sejam avaliados por consumidores para que seja determinado se as diferenças analíticas são perceptíveis e, sendo assim, como elas influenciam a opinião e atitude dos consumidores. Por exemplo, em relação à atenuação da força de cisalhamento detectada nesse experimento: 1) a intensidade de diferença em relação ao controle foi suficiente para ser percebida por consumidores? 2) Se positivo, considerando que o amolecimento é um dos principais indicadores de perda de qualidade de peixes durante armazenamento, seria essa percepção interpretada como benéfica ou adversa para qualidade das sardinhas? Não há, em toda literatura consultada, consistência de informação sobre essa questão. Essa mesma avaliação precisa ser estendida aos demais efeitos para verificar se foram prejudiciais ou benéficas essas diferenças na percepção e opinião dos consumidores.
3. Considerando que o principal efeito potencialmente adverso da aplicação da APH em filés de sardinha foi a alteração da cor, torna-se indispensável realizar avaliações sobre formas de prevenir esse efeito. Considerando os bons resultados encontrados por pesquisas que avaliaram em outros peixes, frutos do mar e animais terrestres, os efeitos da adição de EDTA na estabilidade oxidativa de tais amostras, pesquisas adicionais em torno desse tema são necessárias. Formas de adição e concentração desse sal podem influenciar a estabilidade das amostras e podem atuar como atenuador de parte desses efeitos causados pela APH.
4. As avaliações realizadas nessa tese foram muito influenciadas pela qualidade inicial das amostras. A presente pesquisa, principalmente nos capítulos 4 e 5, prezou por realizar coletas de amostras com maior qualidade possível, procedendo, para isso, rigorosa seleção de amostras junto aos barcos pesqueiros e, posteriormente, uma segunda triagem selecionando as melhores amostras entre todas coletadas. Considerando o volume de sardinhas não selecionadas ou descartadas por não apresentarem “qualidade requerida” para a pesquisa, tal rigor de seleção é totalmente

inviável de ser implementado industrialmente. Logo, sugere-se realização de novas pesquisas com amostras representativas do cenário industrial pesqueiro nacional;

5. Torna-se indispensável avaliação e otimização de metodologias para análise de qualidade física e química de sardinhas. Existe uma grande variedade de métodos publicados que, por vezes, guardam alto grau de semelhança com o método original, com pequenas adaptações, ou exibem grande diferença. Essas discrepâncias podem fragilizar comparações entre trabalhos distintos, dificultado a compreensão de resultados bem como os mecanismos e eventuais formas de controle. Sugere-se profunda avaliação quanto aos métodos a serem utilizados e, principalmente, que o processo de validação, bem como do descarte de eventuais métodos, seja publicado em revistas de alto impacto. Por mais que hajam limitações operacionais e instrumentais à realização de análises seguindo métodos precisamente como são descritos, é preciso ter segurança analítica suficiente de que adaptações não influenciem os resultados e, logo, essas precisam ser feitas com muita cautela;

REFERENCIAS

1. ADEKUNTE, A.; TIWARI, B.; CULLEN, P.; SCANNELL, A.; O'DONNELL, C. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 500–507, 2010.
2. AHMED, Z.; DONKOR, O.; STREET, W. A. Calpains- and myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 130–146, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.002>>.
3. AHN, J.; LEE, H.-Y.; BALASUBRAMANIAM, V. Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores in low-acid foods by pressure-assisted thermal processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 174–178, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6700>>.
4. ALBERTO, F.; BARRAZA, A.; AGUSTÍN, R.; LEÓN, Q.; ÁLVAREZ, X. L. Kinetics of protein and textural changes in atlantic salmon under frozen storage. **Food Chemistry**, v. 182, n. 1, p. 120–127, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.055>>.
5. ALBERTOS, I.; JAIME, I.; MARÍA, A.; GONZ, L.; RICO, D. Carob seed peel as natural antioxidant in minced and refrigerated (4 °C) Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 650–656, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.037>>.
6. ALPAS, H.; AKHAN, C. Shelf-life extension and safety concerns about haddock (*Merlangius euxinus*) under high hydrostatic pressure. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 4, p. 517-527, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfs.12015>>.
7. AMANATIDOU, A. Effect of combined application of high pressure treatment and modified atmospheres on the shelf life of fresh Atlantic salmon. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, n. 2, p. 87–98, 2000.
8. ANDRADE, S. D. C. S.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; GODOY, R. L. D. O.; PACHECO, S.; QUEIROZ, M. D. F.; GUIMARÃES, C. F. M. Validade comercial de sardinhas inteiras e refrigeradas avaliada por análises físico-químicas, bacteriológicas e sensorial. **Ciência Rural**, v. 42, n. 10, p. 1901–1907, 2012.
9. ANDRADE, S. D. C. S.; MÁRSICO, E. T.; LUIZ, R.; GODOY, D. O.; PACHECO, S.; FRANCO, R. M.; MANO, S. B.; CONTE-JUNIOR, C. A. Chemical Quality Indexes of Mullet (*Mugilplatanus*) Stored on Ice. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1030–1039, 2014.
10. ANGRA DOS REIS. **A pesca na baía de Ilha Grande**. Disponível em: <http://www.angra.rj.gov.br/secretaria_spe_artedepesca.asp?IndexSigla=SPE&vNomeLink=Arte de Pesca Artesanal#.WPOOymnyvIU>.
11. ANGSUPANICH, K.; EDDE, M.; LEDWARD, D. A. Effects of high pressure on the myofibrillar proteins of cod and Turkey muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 92–99, 1999.
12. ANGSUPANICH, K.; LEDWARD, D. A. High pressure treatment effects on cod (*Gadus morhua*) muscle. **Food Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 39–50, 1998.
13. ASHIE, I. N. A.; SIMPSON, B. K. Application of high hydrostatic pressure to control enzyme related fresh seafood texture deterioration. **Food Research International**, v. 29, n. 5–6, p. 569–575, 1996.
14. ASHIE, I. N. A.; SIMPSON, B. K.; RAMASWAMY, H. S. CHANGES IN TEXTURE AND MICROSTRUCTURE OF PRESSURE-TREATED FISH MUSCLE TISSUE DURING CHILLED STORAGE. v. 8, p. 13–32, 1997.
15. AUBOURG, S. P.; QUITRAL, V.; ANGE, M.; MAIER, L.; VINAGRE, J. Autolytic degradation and microbiological activity in farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)

- during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 104, p. 369–375, 2007.
16. AUBOURG, S. P.; TORRES, J. A.; SARAIVA, J. A.; GUERRA-RODRÍGUEZ, E.; VÁZQUEZ, M. Effect of high-pressure treatments applied before freezing and frozen storage on the functional and sensory properties of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 100–106, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.01.028>>.
 17. BABAKHANI, A.; FARVIN, K. H. S.; JACOBSEN, C. Antioxidative Effect of Seaweed Extracts in Chilled Storage of Minced Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*): Effect on Lipid and Protein Oxidation. **Food and Bioprocess Technology**, p. 352–364, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-015-1630-9>>.
 18. BAJOVIC, B.; BOLUMAR, T.; HEINZ, V. Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. **Meat Science**, v. 92, n. 3, p. 280–289, nov. 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.024>>.
 19. BAK, K. H.; LINDAHL, G.; KARLSSON, A. H.; LLORET, E.; GOU, P.; ARNAU, J.; ORLIEN, V. The effect of high pressure and residual oxygen on the color stability of minced cured restructured ham at different levels of drying, pH, and NaCl. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 433–443, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.015>>.
 20. BAK, K. H.; LINDAHL, G.; KARLSSON, A. H.; ORLIEN, V. Effect of high pressure, temperature, and storage on the color of porcine longissimus dorsi. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 374–381, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.002>>.
 21. BALASUBRAMANIAM, V. M.; FARKAS, D.; TUREK, E. J. Preserving Foods through High-Pressure Processing. **Food Technology**, v. 62, n. 11, p. 32–38, 2008.
 22. BALASUBRAMANIAM, V. M.; TING, E. Y.; STEWART, C. M.; ROBBINS, J. A. Recommended laboratory practices for conducting high-pressure microbial inactivation experiments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 3, p. 299–306, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.04.001>>.
 23. BALOI, M.; DE CARVALHO, C. V. A.; STERZELECKI, F. C.; PASSINI, G.; CERQUEIRA, V. R. Effects of feeding frequency on growth, feed efficiency and body composition of juveniles Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (Steindacher 1879). **Aquaculture Research**, v. 47, p. 1–7, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/are.12514>>.
 24. BALOI, M. F.; STERZELECKI, F. C.; SUGAI, J. K.; PASSINI, G.; CARVALHO, C. V. A.; CERQUEIRA, V. R. Growth performance, body composition and metabolic response to feeding rates in juvenile Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. **Aquaculture Nutrition**, n. May 2016, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/anu.12521>>.
 25. BARBA, F. J.; SHIFERAW, N.; BUCKOW, R.; KNORR, D.; ORLIEN, V. New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods . A review. **Food Research International**, v. 77, p. 725–742, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.015>>.
 26. BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; MEDINA-MEZA, I.; CANDOĞAN, K.; BERMÚDEZ-AGUIRRE, D. Advanced retorting, microwave assisted thermal sterilization (MATS), and pressure assisted thermal sterilization (PATS) to process meat products. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 420–434, nov. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.027>>.
 27. BELTRAN, E.; PLA, R.; YUSTE, J.; MOR-MUR, M. Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. **Meat Science**, v. 66, n. 3, p. 719–725, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.07.004>>.
 28. BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. An Update on High Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 44–61, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12393-010-9030-4>>.
 29. BINDU, J.; GINSON, J.; KAMALAKANTH, C. K.; ASHA, K. K.; SRINIVASA GOPAL, T. K. Physico-chemical changes in high pressure treated Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*) during chill storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 17,

- p. 37–42, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.003>>.
30. BOLUMAR, T.; ANDERSEN, M. L.; ORLIEN, V. Mechanisms of radical formation in beef and chicken meat during high pressure processing evaluated by electron spin resonance detection and the addition of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 150, p. 422–428, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.161>>.
 31. BOWKER, B.; ZHUANG, H. Relationship between water-holding capacity and protein denaturation in broiler breast meat. **Poultry Science**, v. 94, n. 7, p. 1657–1664, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps/pev120>>.
 32. BRASIL. **Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, Lei Nº 11.959, de 29 de Junho de 2009**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/lei/111959.htm>.
 33. BRASIL. **Boletim Estatístico de Pesca e Aquicultura - 2011**.
 34. BRIONES-LABARCA, V.; PEREZ-WON, M.; ZAMARCA, M.; AGUILERA-RADIC, J. M.; TABILO-MUNIZAGA, G. Effects of high hydrostatic pressure on microstructure, texture, colour and biochemical changes of red abalone (*Haliotis rufecens*) during cold storage time. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 13, p. 42–50, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2011.09.002>>.
 35. BUCKOW, R.; SIKES, A.; TUME, R. Effect of High Pressure on Physicochemical Properties of Meat. v. 57, n. 3, p. 770–786, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.560296>>.
 36. CALANCHE, J.; SAMAYOA, S.; ALONSO, V.; PROVINCIAL, L.; RONCALÉS, P.; BELTRÁN, J. a. Assessing the effectiveness of a cold chain for fresh fish salmon (*Salmo salar*) and sardine (*Sardina pilchardus*) in a food processing plant. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 126–135, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.005>>.
 37. CAMPUS, M. High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. **Food Engineering Reviews**, v. 2, n. 4, p. 256–273, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12393-010-9028-y>>.
 38. CAMPUS, M.; ADDIS, M. F.; CAPPUCINELLI, R.; PORCU, M. C.; PRETTI, L.; TEDDE, V.; SECCHI, N.; STARA, G.; ROGGIO, T. Stress relaxation behaviour and structural changes of muscle tissues from Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) following high pressure treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 2, p. 192–198, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.013>>.
 39. CARDENIA, V.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T.; BALDACCI, E.; LERCKER, G. Health-related lipids components of sardine muscle as affected by photooxidation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 32–38, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.053>>.
 40. CARLEZ, A.; VECIANA-NOGUES, T.; CHEFTEL, J.-C. Changes in colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 5, p. 528–538, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/fstl.1995.0088>>.
 41. CAVA, R.; LADERO, L.; GONZÁLEZ, S.; CARRASCO, A.; RAMÍREZ, M. R. Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 76–81, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.09.005>>.
 42. CERGOLE, M. C.; DIAS-NETO, J. **Plano de Gestão para o uso sustentável da sardinha-verdadeira *Sardinella brasiliensis* no Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/planogestaosardinhaverdadeiradigital.pdf>>.
 43. CERGOLE, M. C.; SACCARDO, S. A.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the brazilian sardine (*Sardinella brasiliensis*) 1977-1997. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 50, n. 848, p. 13–26, 2002.
 44. CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; FAUSTMAN, C. Changes of

- pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 607–617, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.035>>.
45. CHAIJAN, M.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; FAUSTMAN, C. Changes of lipids in sardine (*Sardinella gibbosa*) muscle during iced storage. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 83–91, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.022>>.
 46. CHATZIKYRIAKIDOU, K.; KATSANIDIS, E. Impact of initial handling and subsequent storage conditions on the safety and keeping quality of sardines. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1105–1110, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.165>>.
 47. CHEAH, P. B.; LEDWARD, D. A. High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. **Meat Science**, v. 43, n. 2, p. 123–134, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0309-1740\(96\)84584-0](https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)84584-0)>.
 48. CHEFTEL, J. C.; CULIOLI, J. Effects of high pressure on meat: A review. **Meat Science**, v. 43, n. 2, p. 123–124, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0309-1740\(96\)84584-0](https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)84584-0)>.
 49. CHÉRET, R.; CHAPLEAU, N.; DELBARRE-LADRAT, C.; VERREZ-BAGNIS, V. Effects of high pressure on texture and microstructure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets. **Journal of Food Science**, v. 70, p. e477–e483, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11518.x>>.
 50. CHÉRET, R.; HERNÁNDEZ-ANDRÉS, A.; DELBARRE-LADRAT, C.; DE LAMBALLERIE, M.; VERREZ-BAGNIS, V. Proteins and proteolytic activity changes during refrigerated storage in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle after high-pressure treatment. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 5–6, p. 527–535, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00217-005-0158-z>>.
 51. CHEVALIER, D.; BAIL, A. L.; GHOUL, M. Effects of high pressure treatment (100 ± 200 MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle. **Food Research International**, v. 34, p. 425–429, 2001. < Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00187-3)>.
 52. CHOUHAN, A.; KAUR, B. P.; RAO, P. S. Effect of high pressure processing and thermal treatment on quality of hilsa (*Tenulosa ilisha*) fillets during refrigerated storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 29, p. 151–160, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.03.016>>.
 53. CHRISTENSEN, L. B.; HOVDA, M. B.; RODE, T. M. Quality changes in high pressure processed cod , salmon and mackerel during storage. **Food Control**, v. 72, p. 90–96, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.037>>.
 54. CLARIANA, M.; GARCÍA-REGUEIRO, J. A. Effect of high pressure processing on cholesterol oxidation products in vacuum packaged sliced dry-cured ham. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1468–1471, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.027>>.
 55. CONWAY, E. J.; BYRNE, A. An absorption apparatus for the microdetermination of certain volatile substances: the micro-determination of ammonia. **Biochemical Journal**, v. 27, p. 419–429, 1933.
 56. CRUZ-ROMERO, M. C.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Fatty acids, volatile compounds and colour changes in high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 54–61, 2008. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.05.003>>.
 57. CRUZ-ROMERO, M.; KELLY, A. L.; KERRY, J. P. Effects of high-pressure and heat treatments on physical and biochemical characteristics of oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 1, p. 30–38, 2007. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.05.002>>.
 58. CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1139–1147, 2008. < Disponível em: <<https://doi.org/>

- 10.1016/j.foodcont.2007.12.004>.
59. CRUZ-ROMERO, M.; SMIDDY, M.; HILL, C.; KERRY, J. P.; KELLY, A. L. Effects of high pressure treatment on physicochemical characteristics of fresh oysters (*Crassostrea gigas*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 5, n. 2, p. 161–169, 2004. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.01.002>>.
 60. DEFAYE, a. B.; LEDWARD, D. a.; MACDOUGALL, D. B.; TESTER, R. F. Renaturation of metmyoglobin subjected to high isostatic pressure. **Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 19–22, 1995. < Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)P4175-F](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)P4175-F)>.
 61. DELBARRE-LADRAT, C.; CHÉRET, R.; TAYLOR, R.; VERREZ-BAGNIS, V. Trends in Postmortem Aging in Fish: Understanding of Proteolysis and Disorganization of the Myofibrillar Structure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 5, p. 409–421, 2006. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408390591000929>>.
 62. DELLES, R. M.; XIONG, Y. L. The effect of protein oxidation on hydration and water-binding in pork packaged in an oxygen-enriched atmosphere. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 181–188, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.022>>.
 63. EFSA. Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid. **EFSA Journal**, v. 10, n. 7, p. 1–48, 2012.
 64. ERKAN, N.; OZKAN, O. Quality assessment of whole and gutted sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1549–1559, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01579.x>>.
 65. ERKAN, N.; ÜRETENER, G.; ALPAS, H. Effect of high pressure (HP) on the quality and shelf life of red mullet (*Mullus surmelutus*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 259–264, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.001>>.
 66. ERKAN, N.; ÜRETENER, G.; ALPAS, H. Effect of High Hydrostatic Pressure (HHP) Treatment on Physicochemical Properties of Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 7, p. 1322–1329, 2011. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11947-010-0415-4>>.
 67. ERKAN, N.; ÜRETENER, G.; ALPAS, H.; SELÇUK, A.; ÖZDEN, Ö.; BUZRUL, S. The effect of different high pressure conditions on the quality and shelf life of cold smoked fish. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 2, p. 104–110, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2010.12.004>>.
 68. ESTÉVEZ, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. **Meat Science**, v. 89, n. 3, p. 259–279, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.025>>.
 69. FAO. **FAO Fisheries and Aquaculture Department Summary tables of Fishery Statistics**. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/default.htm>>.
 70. FAUSTMAN, C.; SUN, Q.; MANCINI, R.; SUMAN, S. P. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 86–94, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025>>.
 71. FERNANDES, C. E.; VASCONCELOS, M. A. D. S.; RIBEIRO, M. D. A.; SARUBBO, L. A.; ANDRADE, S. A. C.; FILHO, A. B. D. M. Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. **Food chemistry**, v. 160, p. 67–71, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.055>>.
 72. FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. a. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 345–353, 1997. < Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00114-8)>.
 73. FERRARO, V.; CARVALHO, A. P.; PICCIRILLO, C.; SANTOS, M. M.; PAULA, P. M.; E. PINTADO, M. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues - A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 6, p. 3111–3120, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.003>>.

74. FIGUEIREDO, B. C.; BRAGAGNOLO, N.; SKIBSTED, L. H.; ORLIEN, V. Inhibition of Cholesterol and Polyunsaturated Fatty Acids Oxidation through the Use of Annatto and Bixin in High-Pressure Processed Fish. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. C1646–C1653, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12964>>.
75. FIPERJ. Fundação Instituto de Pesca do estado do Rio de Janeiro - Relatório 2015. p. 174, 2015. Disponível em: <http://www.fiperj.rj.gov.br/fiperj_imagens/arquivos/revistarelatorios2015.pdf>.
76. FIRETTI, R.; ASTOLPHI, Jo. L. de L.; GARCIA, S. M. AQUISIÇÃO DE PESCADOS PARA CONSUMO DOMICILIAR NA REGIÃO SUDESTE : análise a partir da pesquisa de orçamentos familiares 2009 1. **Rev. de Economia Agrícola**, v. 60, n. 1, p. 17–30, 2013. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/publicar/rea2013-1/rea1-1-06f2.pdf>>.
77. FUENTES, V.; VENTANAS, J.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S. Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. **Meat Science**, v. 85, n. 3, p. 506–514, 2010. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.02.024>>.
78. FULLADOSA, E.; SERRA, X.; GOU, P.; ARNAU, J. Effects of potassium lactate and high pressure on transglutaminase restructured dry-cured hams with reduced salt content. **Meat Science**, v. 82, n. 2, p. 213–218, 2009. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.01.013>>.
79. GARCÍA-ARIAS, M. T.; ÁLVAREZ PONTES, E.; GARCÍA-LINARES, M. C.; GARCÍA-FERNANDEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Cooking-freezing-reheating (CFR) of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. Effect of different cooking and reheating procedures on the proximate and fatty acid compositions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 349–356, 2003a. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00095-5)>.
80. GARCÍA-ARIAS, M. T.; ÁLVAREZ PONTES, E.; GARCÍA-LINARES, M. C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Grilling of sardine fillets. Effects of frozen and thawed modality on their protein quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 8, p. 763–769, 2003b. < Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00097-5)>.
81. GHALY, A. E.; DAVE, D.; BUDGE, S.; BROOKS, M. S. Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques : Review. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 7, p. 859–877, 2010. < Disponível em: <<https://doi.org/10.3844/ajassp.2010.859.877>>.
82. GÖKODLU, N.; ÖZDEN, O.; ERKAN, N. Physical, chemical and sensory analyses of freshly harvested sardines (*Sardina pilchardus*) stored at 4°C. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 7, n. 2, p. 5–15, 1998. Disponível em: <http://doi.org/10.1300/J030v07n02_02>.
83. GÓMEZ-ESTACA, J.; MONTERO, P.; GIMÉNEZ, B.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 511–520, 2007. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.006>>.
84. GONÇALVES, A. A. **Tecnologia de Pescado – Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. First ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
85. GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of light salting , modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 100, p. 287–296, 2007. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.045>>.
86. GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 121–137, 1996. < Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8)>.
87. GRIGORAKIS, K.; TAYLOR, K. D. A.; ALEXIS, M. N. Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). v. 81, p. 263–268, 2003. < Disponível em: <[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00421-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00421-1)>.
88. GROSSI, A.; BOLUMAR, T.; SØLTOFT-JENSEN, J.; ORLIEN, V. High pressure treatment

- of brine enhanced pork semitendinosus: Effect on microbial stability, drip loss, lipid and protein oxidation, and sensory properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 11–21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.011>>.
89. GUDBJORNSDOTTIR, B.; JONSSON, A.; HAFSTEINSSON, H.; HEINZ, V. Effect of high-pressure processing on *Listeria* spp. and on the textural and microstructural properties of cold smoked salmon. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 366–374, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.08.015>>.
 90. GUYON, C.; MEYNIER, A.; LAMBALLERIE, M. Protein and lipid oxidation in meat: a review with emphasis on high-pressure treatments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 50, p. 131–143, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.026>>.
 91. HAYERT, M.; PERRIER-CORNET, J.-M.; GERVAIS, P. A simple method for measuring the pH of acid solutions under high pressure. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 103, n. 12, p. 1785–1789, 1999. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp983204z>>.
 92. HE, H.; ADAMS, R. M.; FARKAS, D. F.; MORRISSEY, M. T. Use of High-pressure Processing for Oyster Shucking and Shelf-life Extension. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, p. 640–645, 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10652.x>>.
 93. HE, Z.; HUANG, Y.; LI, H.; QIN, G.; WANG, T.; YANG, J. Effect of high-pressure treatment on the fatty acid composition of intramuscular lipid in pork. **Meat Science**, v. 90, n. 1, p. 170–175, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.06.022>>.
 94. HEDGES, N. D.; GOODBAND, R. M. The influence of high hydrostatic pressure on the water holding capacity of fish muscle. (11-14 First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference - TAFT 2003 33rd WEFTA and 48th AFTC meetings, Ed.) In: Innovative handling and processing, June, Reykjavik - Iceland. **Anais...** Reykjavik - Iceland: 2003.
 95. HICKS, D. T.; PIVARNIK, L. F.; MCDERMOTT, R.; RICHARD, N.; HOOVER, D. G.; KNIEL, K. E. Consumer awareness and willingness to pay for high-pressure processing of ready-to-eat food. **Journal of Food Science Education**, v. 8, n. 2, p. 32–38, 2009. < Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1541-4329.2009.00069.x>>.
 96. HSU, K. C.; HWANG, J. S.; CHI, H. Y.; LAI, K. M. Effect of different high pressure treatments on shucking, biochemical, physical and sensory characteristics of oysters to elaborate a traditional Taiwanese oyster omelette. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 3, p. 530–535, 2010. < Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3854>.
 97. HSU, K. C.; KO, W. C. Effect of Hydrostatic Pressure on Aggregation and Viscoelastic Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Myosin. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 8, p. 1158–1162, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16098.x>>.
 98. HSU, K.; HWANG, J.; YU, C.; JAO, C. Food Chemistry Changes in conformation and in sulfhydryl groups of actomyosin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) on hydrostatic pressure treatment. v. 103, p. 560–564, 2007. < Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.001>.
 99. HUANG, H.; LUNG, H.; YANG, B. B.; WANG, C. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. **Food Control**, v. 40, n. 31, p. 250–259, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.007>>.
 100. HUANG, H. W.; HSU, C. P.; YANG, B. B.; WANG, C. Y. Potential utility of high-pressure processing to address the risk of food allergen concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 1, p. 78–90, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12045>>.
 101. HUANG, H. W.; WU, S.-J.; LU, J.-K.; SHYU, Y.-T.; WANG, C.-Y. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. **Food Control**, v. 72, n. 12, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.019>>.
 102. HUANG, Y.; HE, Z.; LI, H.; LI, F.; WU, Z. Effect of antioxidant on the fatty acid

- composition and lipid oxidation of intramuscular lipid in pressurized pork. **Meat Science**, v. 91, n. 2, p. 137–141, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.006>>.
103. HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. MEAT Mechanisms of water-holding capacity of meat : The role of postmortem biochemical and structural changes. v. 71, p. 194–204, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.022>>.
 104. HUGHES, B. H.; PERKINS, L. B.; YANG, T. C.; SKONBERG, D. I. Impact of post-rigor high pressure processing on the physicochemical and microbial shelf-life of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*). **Food chemistry**, v. 194, p. 487–494, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.144>>.
 105. HUNTERLAB. Hunter Lab Color Scale. **Insights on Color**, v. 8, n. 9, p. 1-15, 1996
 106. HURTADO, J. L.; MONTERO, P.; BORDERÍAS, J. Extension of shelf life of chilled hake (*Merluccius capensis*) by high pressure. **Food Science and Technology International**, v. 6, n. 3, p. 243–249, 2000.
 107. HURTADO, J. L.; MONTERO, P.; BORDERÍAS, J.; SOLAS, M. T. High-pressure/temperature treatment effect on the characteristics of octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 1, p. 22–29, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s002170100321>>.
 108. HWANG, J. S.; LAI, K. M.; HSU, K. C. Changes in textural and rheological properties of gels from tilapia muscle proteins induced by high pressure and setting. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 746–753, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.075>>.
 109. JAIN, D.; PATHARE, P. B.; MANIKANTAN, M. R. Evaluation of texture parameters of Rohu fish (*Labeo rohita*) during iced storage. v. 81, p. 336–340, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.11.006>>.
 110. JANTAKOSON, T.; KIJROONGROJANA, K.; BENJAKUL, S. Effect of high pressure and heat treatments on black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) muscle protein. **International Aquatic Research**, v. 4, n. 1, p. 19, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/2008-6970-4-19>>.
 111. JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7. ed. USA: Business Media, 2005.
 112. JO, Y. J.; JUNG, K. H.; LEE, M. Y.; CHOI, M. J.; MIN, S. G.; HONG, G. P. Effect of high-pressure short-time processing on the physicochemical properties of abalone (*Haliotis discus hannai*) during refrigerated storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 23, p. 33–38, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.02.011>>.
 113. JUNG, S.; GHOUL, M.; DE LAMBALLERIE-ANTON, M. Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 625–631, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00082-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00082-3)>.
 114. KADAM, P. S.; JADHAV, B. A.; SALVE, R. V.; MACHEWAD, G. M. Review on the high pressure technology (hpt) for food preservation. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.1000135>>.
 115. KAMALAKANTH, C. K.; GINSON, J.; BINDU, J.; VENKATESWARLU, R.; DAS, S.; CHAUHAN, O. P.; GOPAL, T. K. S. Effect of high pressure on K-value, microbial and sensory characteristics of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) chunks in EVOH films during chill storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 451–455, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2011.06.001>>.
 116. KARAYANNAKIDIS, P. D.; ZOTOS, A.; PETRIDIS, D.; TAYLOR, K. D. A. Physicochemical changes of sardines (*sardina pilchardus*) at -18c and functional properties of kamaboko gels enhanced with Ca²⁺ ions and MTGase. **Journal of Food Process Engineering**, v. 31, n. 3, p. 372–397, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745->

4530.2007.00158.x

117. KARIM, N. U.; KENNEDY, T.; LINTON, M.; WATSON, S.; GAULT, N.; PATTERSON, M. F. Effect of high pressure processing on the quality of herring (*Clupea harengus*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stored on ice. **Food Control**, v. 22, n. 3–4, p. 476–484, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.030>>.
118. KAUR, B. P.; KAUSHIK, N.; RAO, P. S.; CHAUHAN, O. P. Effect of high-pressure processing on physical, biochemical, and microbiological characteristics of black tiger shrimp (*penaeus monodon*): high-pressure processing of shrimp. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 6, p. 1390–1400, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-0870-1>>.
119. KAUR, B. P.; SRINIVASA RAO, P.; NEMA, P. K. Effect of hydrostatic pressure and holding time on physicochemical quality and microbial inactivation kinetics of black tiger shrimp (*penaeus monodon*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 33, p. 47–55, 2016.. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.002>>.
120. KILINC, B.; CAKLI, S.; TOLASA, S. Quality changes of sardine (*Sardina pilchardus*) patties during refrigerated storage. **Journal Food Quality**, v. 31, p. 366–381, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4557.2008.00205.x>>.
121. KING, N. J.; WHYTE, R. Does it look cooked? A review of factors that influence cooked meat color. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 4, p. 31–40, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00029.x>>.
122. KJÆRSGÅRD, I. V. H.; NØRRELYKKE, M. R.; BARON, C. P. Identification of carbonylated protein in frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and development of protein oxidation during frozen storage partners. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p. 9437–9446, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf061885m>>.
123. KO, W. C.; HSU, K. Changes in k value and microorganisms of tilapia fillet during storage at high-pressure, normal temperature. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 1, p. 94–98, 2001.
124. KO, W. C.; JAO, C. L.; HSU, K. C. Effect of Hydrostatic Pressure on Molecular Conformation of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Myosin. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 68, n. 4, p. 2–5, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09623.x>>.
125. LAKSHMANAN, R.; MISKIN, D.; PIGGOTT, J. R. Quality of vacuum packed cold-smoked salmon during refrigerated storage as affected by high-pressure processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 4, p. 655–661, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1972>>.
126. LAKSHMANAN, R.; PARKINSON, J. A.; PIGGOTT, J. R. High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 544–551, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.015>>.
127. LAKSHMANAN, R.; PATTERSON, M. F.; PIGGOTT, J. R. Effects of high-pressure processing on proteolytic enzymes and proteins in cold-smoked salmon during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 541–548, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.015>>.
128. LEE, E.; KIM, Y.; LEE, N.; HONG, S.; YAMAMOTO, K. Differences in properties of myofibrillar proteins from bovine semitendinosus muscle after hydrostatic pressure or heat treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 46, p. 40–46, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2656>>.
129. LEE, J.; PARK, J. W. Pacific whiting frozen fillets as affected by postharvest processing and storage conditions. **Food Chemistry**, v. 201, p. 177–184, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.083>>.
130. LERFALL, J.; ROTH, B.; FLØNES, E.; HENRIKSEN, A.; BETTEN, T.;

- DZIATKOWIAK-STEFANIAK, M. A.; TORE, B. Pre-mortem stress and the subsequent effect on flesh quality of pre-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during ice storage. **Food Chemistry**, v. 175, p. 157–165, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.111>>.
131. LI, D.; ZHANG, L.; SONG, S.; WANG, Z.; KONG, C.; LUO, Y. The role of microorganisms in the degradation of adenosine triphosphate (ATP) in chill-stored common carp (*Cyprinus carpio*) fillets. **Food Chemistry**, v. 224, p. 347–352, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.056>>.
132. LI, Q.; ZHANG, L.; LU, H.; SONG, S.; LUO, Y. Comparison of postmortem changes in ATP-related compounds, protein degradation and endogenous enzyme activity of white muscle and dark muscle from common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 78, p. 317–324, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.035>>.
133. LISTRAT, A.; LEBRET, B.; LOUVEAU, I.; ASTRUC, T.; BONNET, M.; LEFAUCHEUR, L.; PICARD, B.; BUGEON, J.; PICARD, B.; BUGEON, J.; How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/3182746>>.
134. LIU, D.; LIANG, L.; XIA, W.; REGENSTEIN, J. M.; ZHOU, P. Biochemical and physical changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillets stored at 3 and 0 °C. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 105–114, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.034>>.
135. LOPEZ-HUERTAS, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 200–207, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2009.10.007>>.
136. LOUGOVOIS, V. P.; KYRANA, V. R. Freshness quality and spoilage of chill-stored fish. in: arthur p. riley (Ed.). **Food Policy, Control and Research**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2005. p. 35–86.
137. LULLIEN-PELLERIN, V.; BALNY, C. High-Pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modifications, activity and oligomeric dissociation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 209–221, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00045-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00045-0)>.
138. LUZIA, L. A.; SAMPAIO, G. R.; CASTELLUCCI, C. M. N.; TORRES, E. A. F. S. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. **Food Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 93–97, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00054-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00054-2)>.
139. M.F. PATTERSON. Microbiology of pressure-treated foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1400–1409, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02564.x>>.
140. MA, H. J.; LEDWARD, D. A. High pressure/thermal treatment effects on the texture of beef muscle. **Meat Science**, v. 68, n. 3, p. 347–355, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.001>>.
141. MA, H. J.; LEDWARD, D. A.; ZAMRI, A. I.; FRAZIER, R. A.; ZHOU, G. H. Effects of high pressure/thermal treatment on lipid oxidation in beef and chicken muscle. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1575–1579, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.006>>.
142. MACFARLANE, J. J.; MCKENZIE, I. J.; TURNER, R. H.; JONES, P. N. Binding of communitated meat - Effect of high pressure. **Meat Science**, v. 10, n. 4, p. 307–320, 1984. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740\(84\)90046-9](http://dx.doi.org/10.1016/0309-1740(84)90046-9)>.
143. MALUENDA, D.; ROCO, T.; TABILO-MUNIZAGA, G.; PÉREZ-WON, M.; AUBOURG, S. P. Effect of a previous high hydrostatic pressure treatment on lipid damage in chilled Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*). **Grasas y Aceites**, v. 64, n. 5, p. 472–481,

- 31 dez. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3989/gya.010913>>.
144. MANJU, S.; GOPAL, T. K. S.; JOSE, L.; RAVISHANKAR, C. N.; KUMAR, K. A. Food Chemistry Nucleotide degradation of sodium acetate and potassium sorbate dip treated and vacuum packed Black Pomfret (*Parastromateus niger*) and Pearlsport (*Eetroplus suratensis*) during chill storage. v. 102, p. 699–706, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.059>>.
 145. MARIUTTI, L. R. B.; ORLIEN, V.; BRAGAGNOLO, N.; SKIBSTED, L. H. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 2, p. 337–344, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-007-0726-5>>.
 146. MARSZAŁEK, K.; MITEK, M.; SKĄPSKA, S. The effect of thermal pasteurization and high pressure processing at cold and mild temperatures on the chemical composition, microbial and enzyme activity in strawberry purée. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 48–56, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.10.009>>.
 147. MCARDLE, R.; MARCOS, B.; KERRY, J. P.; MULLEN, A. Monitoring the effects of high pressure processing and temperature on selected beef quality attributes. **Meat Science**, v. 86, n. 3, p. 629–634, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.001>>.
 148. MEDINA-MEZA, I. G.; BARNABA, C.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.10.012>>.
 149. MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; RENERRE, M. Lipid and protein oxidation in vitro , and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. v. 66, p. 467–473, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00135-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00135-9)>.
 150. MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 4, p. 107–112, 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01015-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01015-7)>.
 151. MOHAN, C. O.; RAVISHANKAR, C. N.; LALITHA, K. V.; SRINIVASA GOPAL, T. K. Effect of chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 167–174, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.005>>.
 152. MONTEIRO, M. L. G.; MARSICO, E. T.; CANTO, A. C. V. C. C.; COSTA-LIMA, B. R. C.; COSTA, M. P.; VIANA, F. M.; SILVA, T. J. P.; CONTE-JUNIOR, C. A. Impact of UV-C light on the fatty acid profile and oxidative stability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillets. v. 82, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.13685>>.
 153. MONTERO, P.; PÉREZ-MATEOS, M.; SOLAS, T. Comparison of Different Gelation Methods Using Washed Sardine (*Sardina pilchardus*) Mince: Effects of Temperature and Pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 1, n. 45, p. 4612–4618, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf970400e>>.
 154. MONTIEL, R.; DE ALBA, M.; BRAVO, D.; GAYA, P.; MEDINA, M. Effect of high pressure treatments on smoked cod quality during refrigerated storage. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 429–436, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.011>>.
 155. MOZHAEV, V. V.; HEREMANS, K.; FRANK, J.; MASSON, P.; BALNY, C. High pressure effects on protein structure and function. **Proteins**, v. 24, n. 1, p. 81–91, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199601\)24:1<81::AID-PROT6>3.0.CO;2-R](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199601)24:1<81::AID-PROT6>3.0.CO;2-R)>.
 156. MÚJICA-PAZ, H.; VALDEZ-FRAGOSO, A.; SAMSON, C. T.; WELTI-CHANES, J.; TORRES, A. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 969–985, 2011. Disponível em:

- <<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0543-5>>.
157. MURCHIE, L. W.; CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; SMIDDY, M.; KELLY, A. L. High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 3, p. 257–270, 2005a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.001>>.
 158. MURCHIE, L. W.; CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J. P.; LINTON, M.; PATTERSON, M. F.; SMIDDY, M.; KELLY, A. L. High pressure processing of shellfish : A review of microbiological and other quality aspects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** v. 6, p. 257–270, 2005b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2005.04.001>>.
 159. MURPHY, K. J.; MEYER, B. J.; MORI, T. A.; BURKE, V.; MANSOUR, J.; PATCH, C. S.; TAPSELL, L. C.; NOAKES, M.; CLIFTON, P. A.; BARDEN, A.; PUDDEY, I. B.; BEILIN, L. J.; HOWE, P. R. C. Impact of foods enriched with n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on erythrocyte n-3 levels and cardiovascular risk factors. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 749, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S000711450747252X>>.
 160. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6th. ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2012.
 161. NGUYEN, L. T.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; RATPHITAGSANTI, W. Estimation of accumulated lethality under pressure-assisted thermal processing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 633–644, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-013-1140-6>>.
 162. NUNES, M. L.; BATISTA, I.; CAMPOS, R. M. Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. **Journal Science of Food and Agriculture**, p. 37–43, 1992. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740590106>>.
 163. NUWANTHI, S. G. L. I.; MADAGE, S. S. K.; HEWAJULIGE, I. G. N.; WIJESEKERA, R. G. S. Comparative study on organoleptic , microbiological and chemical qualities of dried fish , Goldstripe Sardinella (*Sardinella gibbosa*) with low salt levels and spices. v. 6, n. Icsusl 2015, p. 356–361, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.072>>.
 164. OCAÑO-HIGUERA, V. M.; MAEDA-MARTINEZ, A. N.; MARQUEZ-RÍOS, E.; CANIZALES-RODRIGUEZ, D. F.; CASTILLO-YIEZ, F. J.; RUÍZ-BUSTOS, E.; GRACIANO-VERDUGO, A. Z.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 49–54, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.034>>.
 165. OCEANA INTERNACIONAL. **A temporada de pesca da sardinha, a maior pescaria do Brasil, abre sem monitoramento oficial**. Disponível em: <<http://brasil.oceana.org/imprensa/comunicados-a-imprensa/temporada-de-pesca-da-sardinha-maior-pescaria-do-brasil-abre-sem>>. Acesso em: 12 abr. 2017.
 166. OHSHIMA, T.; USHIO, H.; KOIZUMI, C. High-pressure processing of fish and fish products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 4, n. 11, p. 370–375, 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90019-7](http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(93)90019-7)>.
 167. OLIVEIRA, F. A.; CABRAL NETO, O.; MARCONDES RODRIGUES DOS SANTOS, L.; HELENA ROCHA FERREIRA, E.; ROSENTHAL, A.; DOS SANTOS, R.; FERREIRA, R. Effect of high pressure on fish meat quality – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.014>>.
 168. OLSSON, G. B.; OFSTAD, R.; LODEMEL, J. B.; OLSEN, R. L. Changes in water-holding capacity of halibut muscle during cold storage. v. 36, p. 771–778, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00098-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00098-7)>.
 169. ORLIEN, V.; HANSEN, E.; SKIBSTED, L. H. Lipid oxidation in high-pressure

- processed chicken breast muscle during chill storage : critical working pressure in relation to oxidation mechanism. **European Food Research and Technology**, v. 211, p. 99–104, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s002179900118>>>
170. ORTEA, I.; RODRÍGUEZ, A.; TABILO-MUNIZAGA, G.; PÉREZ-WON, M.; AUBOURG, S. P. Effect of hydrostatic high-pressure treatment on proteins, lipids and nucleotides in chilled farmed salmon (*Oncorhynchus kisutch*) muscle. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 6, p. 925–934, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-010-1239-1>>.
 171. ÖZOGUL, F.; ÖZOGUL, Y. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. **Food Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 574–578, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.029>>.
 172. ÖZOGUL, F.; POLAT, A.; ÖZOGUL, Y. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 49–57, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.006>>.
 173. PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; ROBLES-BURGUEÑO, M. R. Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 C. **Food Chemistry and Toxicology Postmortem**, v. 65, n. 1, p. 40–47, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15953.x>>.
 174. PAZOS, M.; MAESTRE, R.; GALLARDO, J. M.; MEDINA, I. Proteomic evaluation of myofibrillar carbonylation in chilled fish mince and its inhibition by catechin. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 64–72, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.109>>.
 175. PEREIRA, Á. A. F.; TENUTA-FILHO, A. Avaliação de condições de consumo da sardinha *Sardinella brasiliensis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 720–725, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400015>>.
 176. PEREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P. High-Pressure-Induced Gel of Sardine (*Sardina pilchardus*) Washed Mince as Affected by Pressure-Time-Temperature. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 6, p. 1183–1188, 1997. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb12240.x>>.
 177. PEREZ-WON, M.; TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Effects of Ultra High Pressure on Bay Scallop (*Aequipecten irradians*) Adductor Muscles. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 6, p. 477–484, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1082013205060761>>.
 178. PINTO, A. E. de S. **Sardinha avança entre consumidor mais rico ; atum, entre mais pobres**. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2016/09/1813685-sardinha-avanca-entre-consumidor-mais-rico-atum-entre-mais-pobres.shtml>>. Acesso em: 13 abr. 2017.
 179. RAMIREZ-SUAREZ, J. C.; MORRISSEY, M. T. Effect of high pressure processing (HPP) on shelf life of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) minced muscle. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, n. 1–2, p. 19–27, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2005.08.004>>.
 180. RASTOGI, N. K. **Recent Developments in High Pressure Processing of Foods**. Springer, 2013.
 181. RAWDKUEN, S.; JAIMAKREU, M.; BENJAKUL, S. Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 909–916, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.077>>.
 182. RAWSON, A.; PATRAS, A.; TIWARI, B. K.; NOCI, F.; KOUTCHMA, T.; BRUNTON, N. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. **Food Research**

- International**, v. 44, n. 7, p. 1875–1887, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.053>>.
183. REYES, J. E.; TABILO-MUNIZAGA, G.; PÉREZ-WON, M.; MALUENDA, D.; ROCO, T. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) treatments on microbiological shelf-life of chilled Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 107–112, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.01.010>>.
184. RIEDIGER, N. D.; OTHMAN, R. A.; SUH, M.; MOGHADASIAN, M. H. A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 4, p. 668–679, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jada.2008.12.022>>.
185. RIVALAIN, N.; ROQUAIN, J.; DEMAZEAU, G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences: Pressure effect on biological structures and potential applications in Biotechnologies. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 659–672, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.001>>.
186. RODE, T. M.; HOVDA, M. B. High pressure processing extend the shelf life of fresh salmon, cod and mackerel. **Food Control**, v. 70, p. 242–248, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.045>>.
187. RODRIGUES, B. L.; ALVARES, T. da S.; SAMPAIO, G. S. L.; CABRAL, C. C.; ARAUJO, J. V. A.; FRANCO, R. M.; MANO, S. B.; CONTE JUNIOR, C. A. Influence of vacuum and modified atmosphere packaging in combination with UV-C radiation on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. **Food Control**, v. 60, p. 596–605, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.004>>.
188. RODRIGUEZ-CASADO, A.; CARMONA, P.; MORENO, P.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; MACAGNANO, A.; NATALE, C. Di; CARECHE, M. Structural changes in sardine (*Sardina pilchardus*) muscle during iced storage: Investigation by DRIFT spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1024–1030, 2007b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.054>>.
189. RUXTON, C. H. S.; CALDER, P. C.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. A. The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 113, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1079/NRR200497>>.
190. SAITO, T.; ARAI, K.; MATSUYOSHI, M. A new method for estimating the freshness of fish. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 24, n. 9, p. 749–750, 1959. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2331/suisan.24.749>>.
191. SALDANHA, T.; BENASSI, M. T.; BRAGAGNOLO, N. Fatty acid contents evolution and cholesterol oxides formation in Brazilian sardines (*Sardinella brasiliensis*) as a result of frozen storage followed by grilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1301–1309, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.023>>.
192. SAMARANAYAKE, C. P.; SASTRY, S. K. In-situ pH measurement of selected liquid foods under high pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 17, p. 22–26, jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.09.006>>.
193. SANTOS, W. Sardinha. In: III Encontro da Cadeia Produtiva Sardinheira, Itajaí, SC. **Anais... Itajaí, SC: Sindicato dos Armadores e das Industrias da Pesca de Itajaí e Região – SINDIPI**, 2014. Disponível em: <<http://www.sindipi.com.br/coordenadoria-tecnica/informacoes-tecnicas/apresentacoes>>.
194. SARMA, J.; SRIKAR, L. N.; REDDY, G. V. Effect of ice storage on the functional properties of pink perch and oil sardine meat. **Journal Science of Food and Agriculture** v. 172, n. July 1996, p. 169–172, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199902\)79:2<169::AID-JSFA146>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199902)79:2<169::AID-JSFA146>3.0.CO;2-J)>.
195. SCHENKOVA, N.; SIKULOVA, M.; JELENKOVA, J.; PIPEK, P.; HOUSKA, M.; MAREK, M. Influence of high isostatic pressure and papain treatment on the quality of beef meat. **High Pressure Research**, v. 27, n. 1, p. 163–168, 2007. Disponível em:

- <<http://dx.doi.org/10.1080/08957950601088869>>.
196. SCHINDLER, S.; KRINGS, U.; BERGER, R. G.; ORLIEN, V. Aroma development in high pressure treated beef and chicken meat compared to raw and heat treated. **Meat Science**, v. 86, n. 2, p. 317–323, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.036>>.
 197. SCHUBRING, R. Characterizing protein changes caused by application of high hydrostatic pressure on muscle food by means of DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 82, n. 1, p. 229–237, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10973-005-0872-6>>.
 198. SCHUBRING, R.; MEYER, C.; SCHLÜTER, O.; BOGUSLAWSKI, S.; KNORR, D. Impact of high pressure assisted thawing on the quality of fillets from various fish species. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 3, p. 257–267, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564\(03\)00036-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00036-5)>.
 199. SCORZA, C. A.; ALMEIDA, A.-C. G.; SCORZA, F. A. Chew on this: sardines are still a healthy choice against SUDEP. **Epilepsy & Behavior**, v. 41, p. 21–22, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.08.019>>.
 200. SCORZA, C. A.; CAVALHEIRO, E. A.; CALDERAZZO, L.; DE ALMEIDA, A. C. G.; SCORZA, F. A. Chew on this: Sardines are still a healthy choice against SUDEP. **Epilepsy and Behavior**, v. 41, p. 21–22, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.08.019>>.
 201. SEQUEIRA-MUNOZ, A.; CHEVALIER, D.; LEBAIL, A.; RAMASWAMY, H. S.; SIMPSON, B. K. Physicochemical changes induced in carp (*Cyprinus carpio*) fillets by high pressure processing at low temperature. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, n. 1–2, p. 13–18, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2005.06.006>>.
 202. SEVENICH, R.; BARK, F.; CREWS, C.; ANDERSON, W.; PYE, C.; RIDDELLOVA, K.; HRADECKY, J.; MORAVCOVA, E.; REINEKE, K.; KNORR, D. Effect of high pressure thermal sterilization on the formation of food processing contaminants. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 42–50, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.006>>.
 203. SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends in biochemical sciences**, v. 26, n. 10, p. 612–618, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01949-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01949-1)>.
 204. SILVA, M. K.; ROCHA, F. G.; AMARAL, F. M. Gastronomic use of fish in restaurants of the south of Brazil. **Journal of Culinary Science & Technology**, v. 13, n. 2, p. 159–174, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15428052.2014.952483>>.
 205. SILVA, D. R. B. Da; MIRANDA JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. D. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 2, p. 123–133, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-38292007000200002>>.
 206. SKIPNES, D.; LUND, M.; HENDRICKX, M. E. A method for characterising cook loss and water holding capacity in heat treated cod (*Gadus morhua*) muscle. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1078–1085, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.08.015>>.
 207. STAMATIS, N.; ARKOUELOS, J. S. Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on microbial, chemical and sensory quality indicators of fresh, filleted *Sardina pilchardus* at 3°C. **Journal Science of Food and Agriculture**, v. 1171, n. September 2006, p. 1164–1171, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2858>>.
 208. STIPPL, V. M.; DELGADO, A.; BECKER, T. M. Ionization equilibria at high pressure. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 1–2, p. 151–156, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-004-1130-z>>.
 209. SUZUKI, A.; WATANABE, M.; IWAMURA, K. Effect of High Pressure Treatment

- on the Ultrastructure Muscle pressure to in food processing has attracted much. v. 54, n. 12, p. 3085–3091, 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1990.10870479>>.
210. TANAKA, M.; XUEYI, Z.; NAGASHIMA, Y.; TAUCHI, T. Effect of high pressure on the lipid oxidation in sardine meat. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 57, n. 5, p. 957–963, 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2331/suisan.57.957>>.
 211. TARLEY, C. R. T.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E. Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato sauce. **Food Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 1–6, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.016>>.
 212. TEIXEIRA, B.; FIDALGO, L.; COSTA, G.; CORDEIRO, C.; MARQUES, A.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Changes of Enzymes Activity and Protein Profiles Caused by High-Pressure Processing in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Fillets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 2851–2860, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf3049643>>.
 213. TEIXEIRA, B.; FIDALGO, L.; MENDES, R.; COSTA, G.; CORDEIRO, C.; MARQUES, A.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Effect of high pressure processing in the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets: Pressurization rate, pressure level and holding time. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 31–39, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.12.005>>.
 214. TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; MENDES, R.; GONÇALVES, A.; FIDALGO, L.; OLIVEIRA, M.; SARAIVA, J. A.; NUNES, M. L. Effects of high-pressure processing on the quality of sea bass (*dicentrarchus labrax*) fillets during refrigerated storage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 5, p. 1333–1343, 2014b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-013-1170-0>>.
 215. TEODORO, J. A.; ANDRADE, C. B. De; MANO, S. B. Avaliação da utilização de embalagem em atmosfera modificada sobre a conservação de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, n. 1, p. 158–161, 2007.
 216. TORNBERG, E. MEAT Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, v. 70, p. 493–508, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.11.021>>.
 217. TORRES, J. A.; VÁZQUEZ, M.; SARAIVA, J. A.; GALLARDO, J. M.; AUBOURG, S. P. Lipid damage inhibition by previous high pressure processing in white muscle of frozen horse mackerel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 12, p. 1454–1461, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201300027>>.
 218. TRUONG, B. Q.; BUCKOW, R.; STATHOPOULOS, C. E.; NGUYEN, M. H. Advances in High-Pressure Processing of Fish Muscles. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 2, p. 109–129, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12393-014-9084-9>>.
 219. TUBOLY, E.; LEBOVICS, V. K.; GAÁL, Ö.; MÉSZÁROS, L.; FARKAS, J. Microbiological and lipid oxidation studies on mechanically deboned turkey meat treated by high hydrostatic pressure. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2–3, p. 241–244, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00260-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00260-1)>.
 220. UENO, Y.; IKEUCHI, Y.; SUZUKI, A. Effects of high pressure treatments on intramuscular connective tissue. **Meat Science**, v. 52, n. 2, p. 143–150, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00161-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00161-2)>.
 221. VÁZQUEZ, M.; TORRES, J. A.; GALLARDO, J. M.; SARAIVA, J.; AUBOURG, S. P. Lipid hydrolysis and oxidation development in frozen mackerel (*Scomber scombrus*): Effect of a high hydrostatic pressure pre-treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 24–30, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.12.005>>.
 222. WADA, S.; OGAWA, Y. High pressure effects on fish lipid degradation: myoglobin change and water holding capacity. In: HAYASHI, R.; BALNY, C. (Ed.). **High Pressure Bioscience and Biotechnololy**, v. 13, p. 351–356, 1996. Disponível em:

- <[http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423\(06\)80059-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423(06)80059-6)>.
223. WANG, H.; LIU, X.; ZHANG, Y.; LU, H.; XU, Q.; SHI, C.; LUO, Y. Spoilage potential of three different bacteria isolated from spoiled grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during storage at 4 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 10–17, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.010>>.
 224. WHITEHEAD, P. J. P. FAO species catalogue. Clupeoid fishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 1. Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae. **FAO Fisheries Synopsis 125**, v. 7, n. 303, 1985. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/ac482e/ac482e00.htm>>.
 225. WINTER, R.; JEWORREK, C. Effect of pressure on membranes. **Soft Matter**, v. 5, n. 17, p. 3157, 2009. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b901690b>>. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/B901690B>>.
 226. WONGWICHIAN, C.; KLOMKLAO, S.; PANPIPAT, W.; BENJAKUL, S.; CHAIJAN, M. Interrelationship between myoglobin and lipid oxidations in oxeye scad (*Selar boops*) muscle during iced storage. **Food Chemistry**, v. 174, p. 279–285, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.071>>.
 227. YAGIZ, Y.; KRISTINSSON, H. G.; BALABAN, M. O.; MARSHALL, M. R. Effect of high pressure treatment on the quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mahi mahi (*Coryphaena hippurus*). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 509–515, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00560.x>>.
 228. YAGIZ, Y.; KRISTINSSON, H. G.; BALABAN, M. O.; WELT, B. a.; RALAT, M.; MARSHALL, M. R. Effect of high pressure processing and cooking treatment on the quality of Atlantic salmon. **Food Chemistry**, v. 116, n. 4, p. 828–835, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.029>>.
 229. YI, J.; XU, Q.; HU, X.; DONG, P.; LIAO, X.; ZHANG, Y. Shucking of bay scallop (*Argopecten irradians*) using high hydrostatic pressure and its effect on microbiological and physical quality of adductor muscle. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 57–64, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.02.010>>.
 230. YI, J.; ZHANG, L.; DING, G.; HU, X.; LIAO, X.; ZHANG, Y. High hydrostatic pressure and thermal treatments for ready-to-eat wine-marinated shrimp: An evaluation of microbiological and physicochemical qualities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 16–23, 2013b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.09.006>>.
 231. YIN, M. C.; FAUSTMAN, C.; RIESEN, J. W.; WILLIAMS, S. N. α -Tocopherol and ascorbate delay oxymyoglobin phospholipid oxidation in vitro. v. 58, n. 6, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06164.x>>.
 232. YOSHIOKA, K.; YAMADA, A.; MAKI, T. Application of high pressurization to fish meat: Changes in the physical properties of carp skeletal muscle resulting from high pressure thawing. **Progress in Biotechnology**, v. 13, n. C, p. 369–374, 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423\(06\)80062-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-0423(06)80062-6)>.
 233. YOSHIOKA, K.; YAMAMOTO, T. Changes of Ultrastructure of Carp Muscle and the Physical Properties by High Pressurization. **Fisheries Science**, v. 64, n. 1, p. 89–94, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2331/fishsci.64.89>>.
 234. YU, Y.; LIN, Y.; ZHAN, Y.; HE, J.; ZHU, S. Effect of high pressure processing on the stability of anthocyanin, ascorbic acid and color of Chinese bayberry juice during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 3, p. 701–706, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.036>>.
 235. ZENG, Z.; LI, C.; ERTBJERG, P. Relationship between proteolysis and water-holding of myofibrils. **Meat Science**, v. 131, n. February, p. 48–55, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.04.232>>.
 236. ZHANG, Z.; YANG, Y.; TANG, X.; CHEN, Y.; YOU, Y. Chemical forces and water

- holding capacity study of heat-induced myofibrillar protein gel as affected by high pressure. Abbreviated running title: Effects of high pressure on chemical forces and water holding capacity. **Food Chemistry**, n. 188, p. 111–118, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.129>>.
237. ZHOU, C. L.; LIU, W.; ZHAO, J.; YUAN, C.; SONG, Y.; CHEN, D.; NI, Y. Y.; LI, Q. H. The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical-chemical characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) during refrigerated storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 21, p. 24–34, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.004>>.
238. ZUNIN, P.; BOGGIA, R.; EVANGELISTI, F. Identification and quantification of cholesterol oxidation products in canned tuna. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 10, p. 1037–1040, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11746-001-0384-y>>.

APENDICE I

Desenvolvimento da técnica de cromatografia para avaliação da degradação de nucleotídeos

A avaliação de nucleotídeos da presente pesquisa foi inicialmente baseada no método descrito por Andrade et al (2012). A etapa de extração foi realizada de acordo com o descrito por esses autores, mas modificações na etapa analítica de identificação e quantificação foram implementadas. Ambas as pesquisas foram realizadas com os mesmos equipamentos (extração e quantificação) presentes no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria.

As adaptações na etapa de quantificação foram necessárias para separação completa dos compostos ATP, ADP e AMP (Figura 1). A realização do método conforme descrição original não permitiu a separação individual desses compostos (Figura 2), o que certamente está relacionado à semelhança de polaridade dos compostos uma vez que diferem entre si apenas pela redução de um grupo fosfato (PO_4^{-3}).

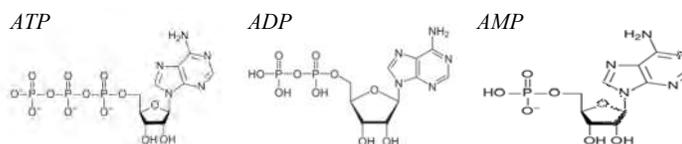


Figura 1 – Nucleotídeos ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato) e AMP (adenosina monofosfato)

Durante as injeções dos padrões, para posterior detecção e quantificação, procedeu-se alteração no volume de injeção (redução de 5 para 2 μl), fluxo das fases móveis (constante em 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) e gradientes das fases móveis, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Composição e fluxo de injeção da fase móvel dos métodos original e adaptação 1.

Métodos Original (Andrade et al., 2012)				Adaptação 1			
Tempo	Fase A ¹	Fase B ²	Fluxo	Tempo	Fase A	Fase B	Fluxo
0,00	100	0	1,0	0,00	100,0	0,0	1,0
2,10	95	5	1,2	4,00	95,0	5,0	1,0
5,00	75	25	1,2	5,50	87,5	12,5	1,0
5,10	100	0	1,2	5,60	0,0	12,5	1,0
9,90	100	0	1,2	6,00	100	0	1,0
10,0	100	0	1,0	10	100	0	1,0

¹Fase A: tampão fosfato (0,04 M KH_2PO_4 e 0,06 M K_2HPO_4 – pH 6,8)

²Fase B: acetonitrila

Os resultados dessa adaptação foram satisfatórios, promovendo boa separação dos compostos de interesse.

No entanto, assim como observado pelos pesquisadores que utilizaram o método original, uma grande quantidade de material retido no sistema era eluído após o último

composto de interesse (inosina). Apesar de o método original prever limpeza da coluna com acetonitrila a cada 15 amostras avaliadas, a presente pesquisa definiu por inserir uma etapa de fluxo de acetonitrila em elevada concentração no método de análise. Ou seja, a cada injeção todo o sistema passou a ser limpo com acetonitrila. Essa etapa certamente contribuiu para melhor preservação da coluna e para manutenção da boa resolução do método. No entanto, para remoção completa da acetonitrila de todo o sistema, o tempo de corrida foi ampliado com manutenção de fluxo da Fase A após acetonitrila.

Tabela 2 – Composição e fluxo de injeção da fase móvel dos métodos Adaptação 2

Tempo	Adaptação 2		Fluxo (ml.min-1)
	Fase A	Fase B	
0,00	100,0	0,0	1,0
4,00	95,0	5,0	1,0
5,50	87,5	12,5	1,0
5,60	0,0	12,5	1,0
6,00	0,0	60,0	1,0
8,00	100,0	0,0	1,0
15,00	100,0	0,0	1,0

¹Fase A: tampão fosfato (0,04 M KH_2PO_4 e 0,06 M K_2HPO_4 – pH 6,8)

²Fase B: acetonitrila

Esse procedimento foi selecionado para injeção de amostras provenientes de sardinhas de prova.

As consecutivas injeções das amostras de prova (extrato de sardinhas feito conforme método original – Andrade et al. 2012) revelou que o método com os atuais parâmetros mostrava-se instável, demandando com frequência variável, de acordo com a qualidade dos cromatogramas (largura de base, resolução dos picos e preservação do tempo de retenção), procedimentos mais drásticos de limpeza. Um indicador importante utilizado para verificar o andamento do processo foi a pressão do sistema, que aumentava a cada injeção, chegando a se aproximar, algumas vezes, do limite operacional estabelecido de 4.000 Psi. O aumento da pressão se relaciona com acúmulo de compostos que se depositam no sistema promovendo resistência ao fluxo da fase móvel.

Com objetivo de melhorar o método, nova adaptação foi realizada para otimizar a limpeza da coluna a cada injeção e tornar o sistema mais estável às diversas injeções consecutivas das amostras. Uma etapa com Fase C (água deionizada) foi inserida no processo entre o fluxo de acetonitrila (Fase A) e tampão fosfato (Fase A) (Tabela 3). O objetivo dessa nova fase foi prevenir o contato direto da ecetonitrila com os sais de fosfato da Fase A, o que poderia estar promovendo precipitação desses sais afetando a eficiência do sistema. Adicionalmente, para assegurar condição inicial estável em todas as amostras, sem presença de residual das Fases B ou C, período de 15 min de equilíbrio foi estabelecido entre cada uma das corridas com fluxo de 100 % de Fase A.

Tabela 2 – Composição e fluxo de injeção da fase móvel do método – Adaptação 3

Adaptação 3				
Tempo (min)	Fase A¹	Fase B²	Fase³	Fluxo (ml.min⁻¹)
0,00	100,0	0,0	0,0	1,0
4,00	95,0	5,0	0,0	1,0
5,50	87,5	12,5	0,0	1,0
5,60	0,0	12,5	87,5	1,0
6,00	0,0	60,0	40,0	1,0
9,00	0,0	60,0	40,0	1,0
9,10	0,0	0,0	100,0	1,0
9,25	0,0	0,0	100,0	1,0
9,50	100,0	0,0	0,0	1,0
15,0	100,0	0,0	0,0	1,0

¹Fase A: tampão fosfato (0,04 M KH₂PO₄ e 0,06 M K₂HPO₄ – pH 6,8)

²Fase B: acetonitrila

³Fase C: água deionizada.

Paralelamente, considerando a possibilidade de que os compostos que se acumulavam no sistema pudessem ser provenientes da Fase A (tampão fosfato), com objetivo de promover limpeza dessa fase, etapas de filtrações em membrana de acetato (0,45 µm – Schleicher & Schuell[®]) e purificação em coluna C18 (LiChroCART[®], 5 µm, 250 x 4 mm, fluxo 1,0 ml.min⁻¹) também foram implementadas.

Esse método final ajustado mostrou-se bastante estável para a avaliação proposta. Ainda sim, a cada injeção, informações como pressão inicial e final das injeções, tempo de retenção de cada composto de interesse, resolução dos picos dos compostos de interesse e o aspecto geral do cromatograma era avaliado.

A presente pesquisa realizou, pelo menos, 120 injeções contendo extrato das amostras. Ainda sim, apesar de em frequência muito mais baixa que a observada ao longo do ajuste do método, limpeza drástica da coluna era realizada quando esses parâmetros mostravam-se alterados.

Como perspectiva de melhoria do método, sugere-se investigações adicionais na extração dos compostos. A extração utilizada é pouco seletiva e, logo, pode estar carreando juntamente com os compostos de interesse uma grande quantidade de outros que podem estar prejudicando a eficiência do sistema. Um ponto de partida pode ser a investigação da extração proposta por Li et al. (2016)^{*}, que empregou lavagens sucessivas da amostra com ácido perclórico seguidas de centrifugação e uma etapa final de filtração (0,22 µm).

Referência Bibliográfica

^{*}LI, D; QIN, N; ZANG, L; LV, J; LI, Q; LUO, Y. Effects of different concentrations of metal ions on degradation of adenosine triphosphate in common carp (*Cyprinus carpio*) fillets stored at 4 °C: An in vivo study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 812–818, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.120>>.

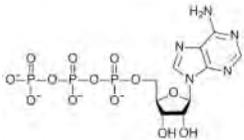
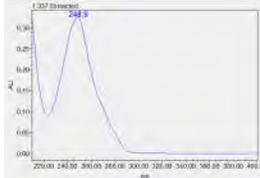
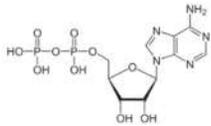
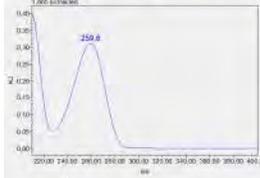
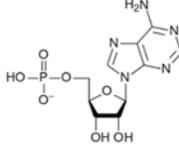
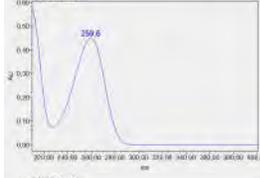
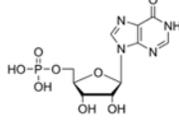
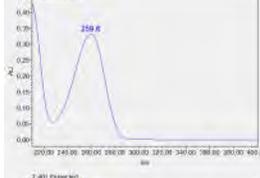
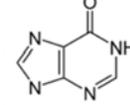
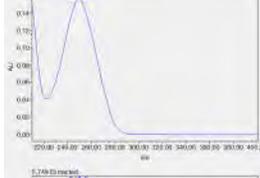
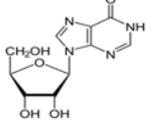
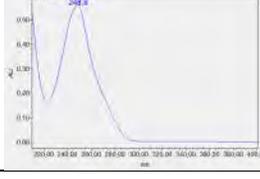
APENDICE II

Identificação e curvas de calibração para quantificação dos nucleotídeos

Identificação

A identificação dos compostos nas amostras de sardinhas foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e espectro de absorvância de cada um dos nucleotídeos. Para determinação desses parâmetros, injeções de soluções (concentrações qualitativas) contendo cada um dos nucleotídeos isolados foram analisadas com os parâmetros cromatográficos ajustados. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Espectro de absorvância e tempo de retenção de cada um dos nucleotídeos

Composto	Espectro de Absorvância	Tempo de retenção
ATP 		1,336 min
ADP 		1,665 min
AMP 		1,810 min
IMP 		2,031 min
Hx 		2,401 min
HxR 		5,749 min

Cromatograma contendo todos os padrões e outro típico das amostras com a identificação de cada um dos compostos é apresentado na Figura 1.

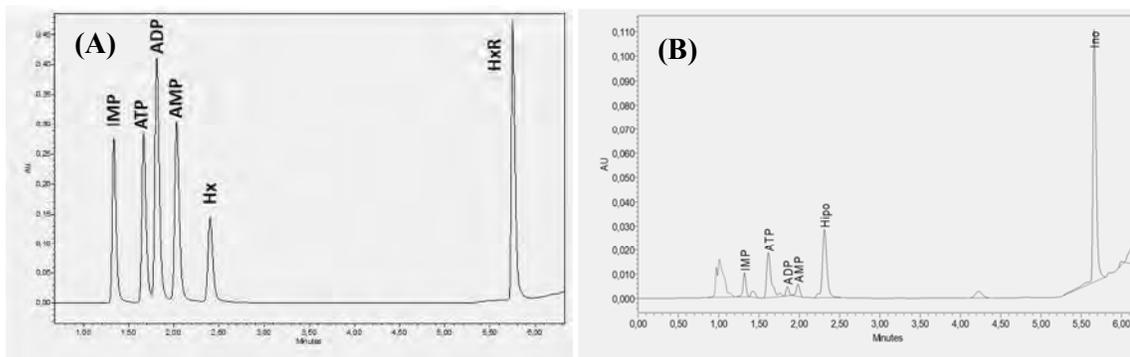


Figura 1 – Cromatograma dos padrões (A) e típico das amostras avaliadas (B).

Curva de calibração

Para curva de calibração, foram pesados aproximadamente 3 mg de cada compostos de interesse e realizadas diluições sucessivas em tampão fosfato (Fase A), conforme Tabela 2. A escolha das diluições se deu de acordo com as áreas dos picos formados em cada uma delas, de maneira que: 1) a maior diluição exibiu área ligeiramente inferior à menor área esperada para os mesmos compostos nas amostras e 2) a menor diluição exibiu área ligeiramente superior à maior área esperada para os mesmos compostos nas amostras.

Tabela 2 – Diluições utilizadas para realização da curva de calibração para quantificação dos nucleotídeos

Composto	Peso (mg)	Dissolução em 1 ml	Concentrações nas diluições ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)				
			D1 (1:11)	D2 (1:26)	D3 (1:51)	D4 (1:76)	D5 (1:101)
ATP	3,1	$3,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	281,818	119,231	60,784	40,789	30,693
ADP	2,6	$2,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	236,364	100,000	50,980	34,211	25,743
AMP	2,9	$2,9 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	263,636	111,538	56,863	38,158	28,713
IMP	3,1	$3,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	281,818	119,231	60,784	40,789	30,693
HxR	2,5	$2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	227,273	96,154	49,020	32,895	24,752
HxR	2,3	$2,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	209,091	88,462	45,098	30,263	22,772

As áreas produzidas por cada uma das concentrações foram alimentadas no sistema do cromatógrafo para o cálculo das equações de regressão, que são exibidas na Tabela 3.

Tabela 3 – Curva de calibração para cálculo das concentrações de cada um dos nucleotídeos

Nucleotídeo	Equação	R ²
ATP	$Y = 2,81e + 0,002x$	$> 0,9999$
ADP	$Y = 5,14e + 0,002x$	$> 0,9999$
AMP	$Y = 3,65e + 0,002x$	$> 0,9999$
IMP	$Y = 2,66e + 0,002x$	$> 0,9999$
HxR	$Y = 2,39e + 0,002x$	$> 0,9999$
Hx	$Y = 6,00e + 0,002x$	$> 0,9999$