



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



ELETRONARCOSE COMO MÉTODO DE INSENSIBILIZAÇÃO PARA A TILÁPIA DO NILO

ADRIANA CRISTINA BORDIGNON

Engenheira de Pesca

Jaboticabal-SP

2015

ELETRONARCOSE COMO MÉTODO DE INSENSIBILIZAÇÃO PARA A TILÁPIA DO NILO

ADRIANA CRISTINA BORDIGNON

ORIENTADORA: Profa.Dra. ELISABETE MARIA MACEDO VIEGAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP-CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal-SP

2015

B729e Bordignon, Adriana Cristina
Eletronarcose como método de insensibilização para a tilápia do Nilo / Adriana Cristina Bordignon. -- Jaboticabal, 2015
x, 136 p. ; il. ; 29 cm

Tese (doutorado) -- Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP)
da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Elisabete Maria Macedo Viegas

Banca examinadora: Giuliana Parisi, Judite Lapa-Guimarães,
Juliana Antunes Galvão, Rose Meire Vidotti

Bibliografia

1. Bem-estar animal. 2. Abate. 3. Conservação pescado. I. Título.
II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.06

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
AGRADECIMENTOS	viii
1. RESUMO GERAL.....	1
2. GENERAL ABSTRACT	3
3. INTRODUÇÃO GERAL	5
3.1. Aquicultura mundial e no Brasil.....	5
3.2. Tilapicultura no Brasil.....	6
3.3. Bem-estar e senciência em peixes	7
3.4. Estresse em peixes.....	11
3.5. Métodos de abate em peixes	12
3.6. Indicadores físico-químicos para avaliação do pescado	18
3.6.1. Análises microbiológicas	19
3.6.2. Rigor Mortis	20
3.6.3. Capacidade de retenção de água (CRA).....	22
3.6.4. Perdas por cozimento e por exsudação	22
3.6.5. Potencial hidrogeniônico (pH)	23
3.6.6. Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV).....	24
3.6.7. Oxidação de lipídios em peixes	24
3.6.8. Medida dielétrica (Fish Freshness Meter)	25
3.6.9. Desnaturação protéica (DSC)	26
3.6.10. Degradação do ATP e seus catabólitos	27
3.6.11. Cor Instrumental	28
3.6.12. Textura Instrumental.....	29
3.6.13. Análise Sensorial.....	29
4. OBJETIVO GERAL.....	31
4.1. Objetivos específicos.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
6. CAPÍTULO I INSENSIBILIZAÇÃO ELÉTRICA EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>): AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS	

COMPORTAMENTAIS, RESPOSTA AOS ESTÍMULOS E REFLEXOS CLÍNICOS.
42

6.1. RESUMO:	42
6.2. ABSTRACT:.....	43
6.3. INTRODUÇÃO	44
6.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.6. CONCLUSÕES.....	54
6.7. AGRADECIMENTOS	55
6.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
6.9. ANEXO I	59
7. CAPÍTULO II AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA CARNE RESFRIADA DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) SUBMETIDA A TRÊS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO	60
7.1. RESUMO:	60
7.2. ABSTRACT:.....	61
7.3. INTRODUÇÃO	62
7.4. MATERIAIS E MÉTODOS	64
7.4.1. Métodos de insensibilização.....	65
7.4.2. Procedimento Experimental	65
7.4.3. Métodos analíticos.....	66
7.4.4. Análise Estatística	70
7.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
7.5.1. Parâmetros de qualidade de água e insensibilização dos peixes.	71
7.5.2. Rigor mortis	73
7.5.3. Medidas de pH muscular e pH ocular.....	75
7.5.4. Medidas dielétricas.....	77
7.5.5. Índice de alteração dos filés	79
7.5.6. Bases Nitrogenadas Voláteis e Nitrogênio Não Protéico.....	79
7.5.7. Textura Instrumental.....	82
7.5.8. Coloração do filé.....	84
7.5.9. Degradação do ATP e seus catabólitos	86
7.5.10. Análise sensorial	90
7.5.11. Microbiologia	92

7.6.	CONCLUSÕES.....	93
7.7.	AGRADECIMENTOS.....	93
7.8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
8.	CAPITULO III TRÊS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO EM TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO FILÉ CONGELADO.....	101
8.1.	RESUMO:	101
8.2.	ABSTRACT:.....	102
8.3.	INTRODUÇÃO.....	103
8.4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	105
8.4.1.	Peixes.....	105
8.4.2.	Métodos de insensibilização.....	105
8.4.3.	Procedimento Experimental	106
8.4.4.	Análises físico-químicas	107
8.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
8.5.1.	Parâmetros de qualidade da água e insensibilização dos peixes ...	111
8.5.2.	Medidas de pH	113
8.5.3.	Nitrogênio Não Protéico e Bases Nitrogenadas Voláteis.....	114
8.5.4.	TBARS	116
8.5.5.	Perdas por cozimento (cooking loss), perdas por exsudação (drip loss) e capacidade de retenção de água (CRA).....	118
8.5.6.	Desnaturação proteica (DSC)	121
8.5.7.	Textura Instrumental.....	123
8.5.8.	Cor instrumental	124
8.5.9.	Análise microbiológica.....	127
8.6.	CONCLUSÕES.....	128
8.7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
8.8.	AGRADECIMENTOS.....	129
8.9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1 Avaliação dos parâmetros de natação, equilíbrio, manipulação, picada, rotação dos olhos e movimento opercular em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	51
Tabela 6.2 Médias do teste de ordenação de cor nos filés de tilápia do Nilo.....	53
Tabela 7.1 Níveis de qualidade do pescado de acordo com o Regulamento da União Européia.....	69
Tabela 7.2 Parâmetros de qualidade de água durante a insensibilização dos peixes aplicando três métodos.	71
Tabela 7.3 Valor - p, para cada variável avaliada entre os tratamentos, ao longo do tempo e interação de tratamento x tempo.	73
Tabela 7.4 Média da intensidade da cor a*, em filés de tilápia resfriados a 4°C e armazenados por 25 dias.	84
Tabela 7.5 Média da intensidade da cor b*, em filés de tilápia resfriados a 4°C e armazenados por 25 dias	85
Tabela 7.6 Valores médios das intensidades de L*, em filés de tilápia resfriados a 4°C durante 25 dias de armazenamento.	85
Tabela 8.1. Parâmetros de qualidade de água e insensibilização dos peixes. ...	111
Tabela 8.2 Valor - p, para cada variável, avaliada entre os tratamentos, ao longo do tempo e na interação de tratamento x tempo.	113
Tabela 8.3 Valores médios de pH em filés congelados de tilápia do Nilo submetidos aos tratamentos de choque térmico, eletronarcose e o controle com anestésico.....	114
Tabela 8.4 Valores médios de TBARS (mg de malonaldeído/kg amostra) em filés de tilápia do Nilo submetidos aos tratamentos choque térmico e eletronarcose e anestésico	117
Tabela 8.5 Valores percentuais (%) das perdas de água por cocção, em filés de tilápia do Nilo	119
Tabela 8.6 Valores médios da temperatura de desnaturação da miosina em filés frescos e congelados de tilápia do Nilo a -18°C.	122
Tabela 8.7 Valores médios da cor a* em filés congelados de tilápia do Nilo e armazenados estocados a -18°C	125
Tabela 8.8 Valores médios da cor b* em filés de tilápia do Nilo em filés congelados e armazenados estocados a -18°C.	126
Tabela 8.9 Valores médios da luminosidade L* em filés congelados de tilápia do Nilo e armazenados estocados a -18°C.	126
Tabela 8.10 Contagem de coliformes totais (Log 10 UFC/g) em filés de tilápia mantidos sob congelamento (-18°C), durante 180 dias.....	127
Tabela 8.11 <i>Staphylococcus aureus</i> (Log 10 UFC/g) em filés de tilápia mantidos sob congelamento (-18°C), durante 180 dias.	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Localização dos nociceptores e receptores químicos na cabeça da truta arco íris.....	10
Figura 3.2 Mecanismos de degradação do ATP.	27
Figura 6.1 Recuperação do movimento opercular e rotação dos olhos em tilápia do Nilo, utilizando diferentes voltagens.	52
Figura 6.2 Filés de tilápia do Nilo utilizados para análise sensorial e cor instrumental.	54
Figura 7.1 Índice de rigor mortis em tilápias do Nilo, insensibilizadas com choque térmico, anestésico e eletronarcose.	74
Figura 7.2 Médias do pH muscular em tilápia do Nilo resfriada a 4°C e estocadas durante 25 dias.	75
Figura 7.3 Médias do pH ocular de tilápias do Nilo, resfriadas a 4°C e estocadas por 25 dias.	77
Figura 7.4 Valores médios da medida dielétrica no músculo da tilápia do Nilo resfriada durante 25 dias.	78
Figura 7.5 Valores de BNV (mg/100g de filé) de tilápia do Nilo resfriada a 4°C e estocada por 25 dias	80
Figura 7.6 Valores de NNP(mg/100g) em filés de tilápia do Nilo resfriada a 4°C e submetidas a diferentes métodos de insensibilização.	82
Figura 7.7 Força de compressão nos filés resfriados de tilápia do Nilo.	83
Figura 7.8 Valores de ATP muscular, investigado nas primeiras horas após o abate (0, 3 e 5h) em tilápia do Nilo refrigerada a 4°C.....	87
Figura 7.9 Degradação do ATP (A) e seus catabólitos ADP (B), AMP (C), IMP (D), INO (E), Hx (F) no músculo da tilápia do Nilo insensibilizada e refrigerada a 4°C.	88
Figura 7.10 Índice K em filés de tilápia armazenados resfriados durante 25 dias.	89
Figura 7.11 Avaliação sensorial externa (A), interna (B) e sensorial do filé (C) da tilápia do Nilo submetida e diferentes métodos de insensibilização.	91
Figura 8.1 Valores médios de Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV) em filés congelados de tilápia do Nilo e estocados a (-18°C), submetidos aos tratamentos de choque térmico e anestésico (A) e eletronarcose (B).	115
Figura 8.2 Valores percentuais da capacidade de retenção de água (CRA) em filés de tilápia do Nilo submetidas aos tratamentos de choque térmico (A), anestésico (B) e eletronarcose (C).	120
Figura 8.3 Teste de compressão dos filés de tilápia do Nilo armazenados congelados a -18°C, durante 180 dias.	124

LISTA DE ABREVIATURAS

<	Menor
>	Maior
ΔH	Entalpia
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
$^{\circ}C$	Grau centigrado
μL	Microlitro
μmol	Micromol
μS	Microsiemens
A	Ampere
a*	Intensidade da Cor Vermelha
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Corrente alternada
ADP	Adenosina Difosfato
AHAW	Animal Health and Welfare
AMP	Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
b*	Intensidade da Cor Amarela
BNV	Bases nitrogenadas voláteis
CAUNESP	Centro de Aquicultura da Unesp
CIE	Commission International de l'Eclairage
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
CRA	Capacidade de Retenção de Água
DC	Corrente contínua
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EEG	Eletroencefalograma
EFSA	European Food Safety Authority
EU	European Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FAWC	Farm Animal Welfare Committee
g	Grama (peso)
h	Horas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Hx	Hipoxantina
Hz	Unidade de frequência
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods

IMP	Inosina Monofosfato
INO	Inosina
IR	Índice de Rigor
J	Joule
K	Valor K
kg	Quilograma (peso)
KH₂PO₄	Fosfato de Potássio Monobásico
L	Litros
L*	Luminosidade
M	Molaridade
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro
mg/mal	Miligrama de malonaldeído
mgN	Miligrama de Nitrogênio
min	Minuto
MIQ	Método do Índice de Qualidade
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
N	Newton
N₂	Nitrogênio
nm	Nanômetro
NMP	Número Mais Provável
NNP	Nitrogênio não protéico
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de vinil
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
SAS	Statistical Analysis System
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Ácido tiobarbiturico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TUKEY	Teste de Comparação de Médias
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
V	Voltagem

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me direcionado ao encontro dessa grande oportunidade de aprendizado e evolução.

À Professora e Orientadora Elisabete Maria Macedo Viegas, obrigada pelos ensinamentos e orientação durante toda essa jornada de aprendizado.

A todos os colegas do Laboratório de Piscicultura e todos que já passaram por aqui colaborando de alguma forma, Paulo, Rachel, Sheyla, Mariene, Julio, Fúlvio, Elaine, Adja, Kátia, Rosa, Joana, Ana Beatriz, Stephanie, Henrique, Samuel, Livia, Betina, Heloisa, Camilo, Diego, Lina e Natalia, muito obrigada!

Em especial aos técnicos Apólinário e Daflin, que temos o privilégio de contar sempre com a ajuda deles, em todas as tarefas que executamos dentro do laboratório.

Aos Professores Paulo Sobral, Carlos de Oliveira e Carlos Corassin pela disponibilização dos laboratórios e aos técnicos Ana Mônica, Rodrigo e Roice pela ajuda na realização das análises.

Aos professores Judite Lapa Guimarães, César Gonçalves de Lima e Júlio César Balieiro pela ajuda na interpretação dos resultados e realização de análises estatísticas.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos por ceder toda a sua infraestrutura para que esse trabalho fosse desenvolvido.

À secretaria da Pós-Graduação do CAUNESP, representada por Veralice e David, que sempre nos auxiliaram em todos os esclarecimentos prestados durante essa jornada acadêmica.

À Universidade Degli Studi di Firenze, representada pela Professora Giuliana Parisi e de seu técnico Tonino, que permitiram que eu pudesse realizar parte das minhas análises nesse lugar maravilhoso na região da Toscana! “Grazie mille”

Aos amigos de fé do Grupo Fraternal Saint Germain, pelo apoio incondicional durante essa jornada, pelos ensinamentos diários e pela compreensão das coisas que acontecem em nossas vidas.

Ao namorado Christian Flaker, por estar sempre do meu lado, brindando o seu apoio, amor e colaboração durante o doutorado, minha eterna “dupla” Te amo!

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa (CNPq nº475374/2012-6).

À CAPES pela bolsa concedida durante a execução do doutorado.

DEDICATÓRIA

*Dedico com muito amor e
carinho aos meus pais*

Geni e Venildo

1. RESUMO GERAL

Questões que envolvem o bem estar dos animais na aquicultura vem despertando grande interesse, devido à utilização de técnicas de manipulação que causam estresse aos animais antes da sua morte. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes métodos de insensibilização em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando a eletronarcose, choque térmico e anestésico como controle, e avaliar os efeitos sobre alterações na qualidade da carne resfriada e congelada. Na primeira etapa a insensibilização foi realizada por eletronarcose, utilizando diferentes voltagens (200V e 100V) e tempos de exposição (20s, 40s, 60s) para verificar qual seria a melhor combinação de voltagem e tempo de exposição. A maioria dos peixes permaneceu insensibilizada com os tratamentos 100V/60s e 200V/60s. Os reflexos clínicos mostraram-se ausentes nos peixes submetidos aos tratamentos 100V/60s, 200V/40s e 200V/60s. O tratamento 100V/60s garantiu condições de bem-estar na insensibilização dos peixes e filés menos hemorrágicos. No segundo experimento, foram testados 3 métodos de insensibilização: 1) eletronarcose (100V/60s), 2) choque térmico (água e gelo) e 3) anestésico (benzocaína). Investigou-se alguns parâmetros de frescor do pescado resfriado a 4°C e estocado por 25 dias. As análises foram realizadas nos tempos amostrais 0; 0,13; 0,21; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias. Os peixes do três métodos de insensibilização testados, apresentaram entrada no estado de rigor mortis aos 7 dias de estocagem, concomitante com reduções dos valores de pH muscular, pH ocular e dos níveis de ATP. Parâmetros como medida dielétrica, textura instrumental, o conteúdo de BNV e NNP apresentaram reduções de seus valores ao longo do tempo de estocagem. O valor K e a análise sensorial dos peixes demonstraram que a tilápia refrigerada apresentou em até 7 dias de armazenamento, bom estado de frescor. A análise microbiológica confirmou que o abate e o processamento foram realizados de forma higiênica. No terceiro experimento foram testados 3 métodos de insensibilização em tilápia: 1) eletronarcose (100V/60s), 2) choque térmico (água e gelo) e 3) benzocaína, seguidos de filetagem e seus filés estocados congelados a -18°C. Análises químicas, físicas e microbiológicas foram realizadas em intervalos de 0, 1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento. A capacidade de retenção de água dos filés apresentou redução de 22,2% aos 60 dias de estocagem para o

choque térmico. As perdas por cozimento foram menores nos três tratamentos aos 90 dias de congelamento. A textura dos filés apresentou uma redução na força de compressão ao longo do tempo. Os métodos de insensibilização testados neste estudo mostraram-se eficientes, preservando a qualidade dos filés e mantendo-os aptos para o consumo com até 180 dias de estocagem, mantidos congelados a -18°C. A contagem dos microrganismos investigados nos filés estava dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira durante todo o período de estocagem. Conclui-se que a eletronarcose foi o método que garantiu de forma instantânea a insensibilização dos peixes, garantindo condições de bem-estar durante procedimentos de abate realizados em tilápia do Nilo.

Palavras chave: bem-estar animal, abate, conservação de pescado, análise sensorial

2. GENERAL ABSTRACT

Animal welfare in aquaculture is attracting great interest, because of the use of handling techniques that cause stress to the animals before death. The objective of this study was to evaluate different methods of stunning/killing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using electronarcosis, thermal shock and the anesthetic as control, and to evaluate the changes in the quality of chilled fish and frozen fillets. In the first stage, the electronarcosis stunning was applied using different voltages (200V and 100V) and exposure times (20s, 40s, 60s) to find what would be the best combination of voltage and exposure time. Most of the fish remained stunned with the treatments 100V/60s and 200V/60s. The clinical reflexes were absent in fish of treatments 100V/60s, 200V/40s and 200V/60s. Treatment 100V/60s ensured welfare conditions in the stunning and less hemorrhagic fillets. The second experiment included three methods of stunning/killing: 1) electronarcosis (100V / 60s), 2) thermal shock (water and ice) and 3) anesthetic (benzocaine). It was investigated some parameters of freshness of fish cooled at 4 °C and stored for 25 days. The analyzes were performed at 0; 0.13; 0.21; 1; 7; 14; 18; 22 and 25 days. The fishes of the three stunning/killing methods tested, entered in the state of rigor mortis after 7 days of storage, with concomitant reductions in muscle and ocular pH, and ATP levels. Parameters such as dielectric measurement, instrumental texture, content of VNB and NPN presented reductions over the storage time. The K value and the sensory analysis of fish showed that chilled tilapia presented within 7 days of storage, good state of freshness. Microbiological analysis confirmed that the slaughter and processing were performed hygienically. In the third experiment, three methods of stunning were tested in tilapia: 1) electronarcosis (100V / 60s), 2) thermal shock (water and ice) and 3) benzocaine, followed by filleting and the fillets stored frozen at - 18 °C. Chemical, physical and microbiological analyzes were performed at intervals of 0, 1, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days of storage. The water holding capacity of fillets was reduced by 22.2% after 60 days of storage for thermal shock. Cooking losses were lower in the three treatments at 90 days of freezing. The texture of fillets showed a reduction in compression force over time. The

stunning/killing methods tested in this study were effective, preserving the quality of the fillets within 180 days of frozen storage kept at -18 ° C. The counting of microorganisms investigated on fillet was within the limits allowed by Brazilian law throughout the storage period. It was concluded that the electronarcosis was the method that ensured instantaneously stunning the fish, ensuring welfare conditions for slaughtering procedures carried out in Nile tilapia.

Keywords: animal welfare, slaughter, conservation of fish, sensory analysis

3. INTRODUÇÃO GERAL

3.1. Aquicultura mundial e no Brasil

A aquicultura é a criação de organismos aquáticos em condições controladas, e pode ser realizada no continente com água doce, ou no mar com água salgada. A aquicultura abrange a criação de peixes, camarões, rãs, jacarés, o cultivo de macro e microalgas e a produção de moluscos, como ostras, mexilhões, caramujos e vieiras (MPA, 2014).

A produção aquícola mundial continua crescendo muito a cada ano, e as últimas estatísticas mostram que chegou a 90,4 milhões de toneladas (t) em 2012 (FAO, 2014). Dentro desse crescimento, destaca-se o cultivo de peixes que passou de 32,4 milhões de toneladas em 2000 para 66,6 milhões t em 2012. O consumo de pescado no mundo também aumentou, sendo que, em 1960 era em torno de 9,9 kg/pessoa/ano, e na década de 2000 aumentou para 17,0 kg, em 2010 chegou a 18,9 kg e estimativas para 2012 apontaram consumo de 19,2 kg. Este aumento ocorre de acordo com uma combinação de vários fatores, como o crescimento populacional, em conjunto com o aumento de renda e urbanização interligadas à forte expansão da produção de peixes e canais de distribuição modernos (FAO, 2014).

O Brasil apresenta 12% da água doce disponível no planeta, e um vasto litoral com mais de oito mil quilômetros de extensão de água para desenvolver o seu enorme potencial para a aquicultura (MPA, 2014). A aquicultura brasileira apresentou significativo crescimento nos últimos anos, passando de 278 mil toneladas em 2003 para 415 mil t em 2009, o que equivale a 35% de incremento em menos de uma década. De acordo com o levantamento preliminar divulgado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura para o ano de 2013, o Brasil produziu aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado e 40% desse montante corresponde a cultivos, logo a atividade gera um PIB pesqueiro de 5 bilhões de reais, além de mobilizar mais de 800 mil profissionais entre pescadores e

aquicultores e proporcionar 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos (MPA, 2014).

Dentro deste contexto a piscicultura atingiu um crescimento de 60,2% entre 2007 e 2009. Isoladamente a produção de tilápia aumentou 105% em apenas sete anos, entre 2003 e 2009. O Brasil poderá se tornar um dos maiores produtores pesqueiros do mundo até 2030, ano em que a produção nacional teria condições de atingir 20 milhões de toneladas (FAO, 2014).

3.2. Tilapicultura no Brasil

As tilápias, espécies do gênero *Oreochromis*, são nativas da África, Israel e Jordânia, espalharam-se pelo mundo nos últimos 50 anos, sendo que a sua produção expandiu-se em mais de 100 países, com diversos climas, sistema de produção e salinidades (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004).

Esses peixes foram introduzidos no Brasil em 1971 no Nordeste, provenientes da Costa do Marfim. No entanto, a produção comercial apresentou destaque somente a partir da década de 90, com o desenvolvimento de tecnologias modernas de produção. Em 1994 a produção mundial foi de 11 mil toneladas passando para 133 mil toneladas em 2009, com perspectivas de que a produção em 2030 chegue a 9,2 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Atualmente a grande produção da tilápia concentra-se em três grandes regiões brasileiras, no nordeste, na região noroeste do estado de São Paulo e no oeste do Estado do Paraná. Na região nordeste merece destaque o estado do Ceará que apresenta uma produção de 59 mil toneladas, sendo atualmente o maior produtor em seus grandes açudes de Castanhão, Orós e Sítios Novos. O estado da Bahia também apresenta cultivos em tanques rede nos reservatórios do Rio São Francisco e na região de Paulo Afonso (SUSSEL, 2011).

O estado de São Paulo apresenta cultivos nos reservatórios do Rio Paraná, Rio Grande e do baixo Rio Tietê apresentando uma produção de 45 mil toneladas. A região oeste do Estado do Paraná, onde predominam os cultivos em tanques escavados, contribuem com 36 mil toneladas (SUSSEL, 2011).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das principais espécies de peixe produzidas em muitos países, inclusive no Brasil, por possuir muitas características desejáveis como carne branca e textura firme, sabor e odor delicado e ausência de espinhos em forma de 'Y' (VANNUCCINI, 1999). Apresenta outras características interessantes como sua facilidade de reprodução e obtenção de machos que apresentam maiores rendimentos em relação às fêmeas (KUBITZA, 2000). Além disso, este peixe aceita diversos tipos de alimentos, apresenta boa conversão alimentar e facilidade de adaptação aos diversos sistemas de produção existentes (BLANCK, 2008).

3.3. Bem-estar e senciência em peixes

O conceito de bem-estar animal é bastante complexo e pode ser definido de várias formas. É uma ciência com foco na interação de humanos e animais, relacionando conceitos de necessidades, liberdade, felicidade, adaptação, controle, capacidade de previsão, sentimentos, sofrimento, dor, ansiedade, medo, tédio, estresse, e saúde (BROOM; MOLENTO, 2004).

Dentro desse contexto de bem-estar animal, muitas questões relevantes devem ser levadas em consideração quando voltamos o nosso estudo para os peixes. Estes são animais que apresentam uma história evolutiva mais longa do que as aves e os mamíferos, e são adaptados para viver permanentemente na água, portanto os peixes diferem de outros grupos de vertebrados (HUNTINGFORD; KADRI, 2014). Por questões evolutivas algumas diferenças se sobressaem em relação a outros animais, como o tamanho do seu cérebro relativamente pequeno e apresenta estruturas simples, o que poderia significar a falta de uma complexidade comportamental e cognitiva necessária para o conceito de bem estar (HUNTINGFORD; KADRI, 2014).

A maioria dos cientistas que estudam o bem-estar em peixes acredita que dentro desse contexto, a condição física é um importante indicador de bem-estar, que pode ser definido como sendo o estado interno que o peixe se encontra em condições livres para fazer suas próprias escolhas num determinado momento (VOLPATO et al., 2007). Portanto é necessário monitorar

as práticas de aquicultura e se preciso torná-las melhores para garantir um ambiente aquático saudável, de modo que se possa observar um animal em bom estado de saúde, como sendo este o primeiro e mais óbvio estado de bem-estar dos peixes. Sinais de lesão ou infecções são importantes indicadores de mal-estar (MARTINS et al., 2012), o sistema imunológico precisa estar fortalecido, de modo que o animal não precise lutar contra uma possível doença (HUNTINGFORD; KADRI, 2014).

Algumas variáveis físicas são importantes para avaliar o estado de bem-estar em peixes como os níveis de reservas nutricionais, as taxas de crescimento e o status reprodutivo. A redução do apetite é um estado de alerta, podendo ser uma resposta ao estresse fisiológico, alguns sinais de angústia como natação errática e movimentos repetitivos ou estereotipados, demonstram um comportamento alterado, portanto esse monitoramento de comportamento é importante para avaliar o bem estar dos peixes (MARTINS et al., 2012).

Estudos sobre o bem-estar animal têm sido realizados já há algum tempo para aves e mamíferos. Em mamíferos, os métodos de insensibilização e o abate induzem o animal a uma perda imediata de consciência e da sensação de dor (EFSA, 2004). Nos últimos anos têm se voltado uma atenção especial para o bem estar em peixes. Na Europa já existem alguns protocolos que asseguram a proteção e o bem estar dos animais, uma vez que já é reconhecido que os peixes apresentam senciência (EFSA, 2004).

A senciência é definida como a capacidade do animal de ter consciência de sensações, como dor, sofrimento, fome, conforto, desconforto e sua capacidade em diferenciar “bom de ruim”, “prazeroso de desagradável” (PEDRAZZANI et al., 2008). Os peixes têm memória explícita, e apresentam um substrato neurológico que demonstra sensibilidade ao sofrimento (SNEDDON 2002; SNEDDON 2003). Portanto, do ponto de vista lógico e ético devemos considerar todos os animais vertebrados como sencientes (PEDRAZZANI et al., 2008).

No dia 07 de julho de 2012, Philip Low escreveu a declaração de Cambridge sobre a consciência de animais, humanos e não humanos. Este documento mostra o reconhecimento da comunidade científica mundial sobre a

senciência dos animais (COSTA et al., 2013). Na declaração um grupo internacional de neurocientistas cognitivos, neurofarmacologistas, neuroanatomistas e neurocientistas computacionais, declararam: a ausência de um neocórtex parece não impedir que um organismo experimente estados afetivos. Evidências convergentes indicam que os animais não humanos têm os substratos neuroanatômicos, neuroquímicos e neurofisiológicos de estados de consciência juntamente com a capacidade de exibir comportamentos intencionais. Consequentemente, o peso das evidências indica que os seres humanos não são os únicos a possuir os substratos neurológicos que geram a consciência. Animais não humanos, incluindo todos os mamíferos e as aves, e muitas outras criaturas, como polvos, também possuem substratos neurológicos (COSTA et al., 2013).

O cérebro dos peixes é relativamente pequeno e simples, quando comparado com aves e mamíferos. Os peixes teleósteos compartilham as mesmas subdivisões clássicas no cérebro em relação à maioria dos animais vertebrados. Apresentam um tronco cerebral, parte posterior do cérebro, o mesencéfalo, um cerebelo, um par de lóbulos ópticos, os hemisférios cerebrais do telencéfalo (cérebro anterior), emparelhados e os bulbos olfativos associados (BRAITHWAITE, 2006).

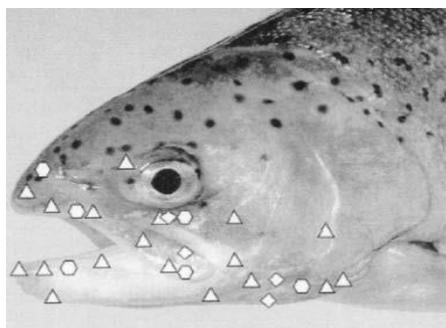
A forma de organização do cérebro dos peixes mostra-se diferente porque não apresenta o neocórtex que nos seres humanos é importante para mediar o estado emocional de sofrimento. Entretanto alguns estudos vêm demonstrando que a função do neocórtex pode ser realizada por diferentes partes do cérebro em peixes, portanto estes apresentam a capacidade de perceber estímulos dolorosos (HUNTINGFORD; KADRI, 2014). Estudos comportamentais, neuroanatômico e neurofisiológicos, sugerem que existe algum nível de consciência nos peixes e que apresentam uma escala filogeneticamente semelhante a dos vertebrados mais evoluídos, entretanto sua forma de sentir dor e medo é considerada mais primitiva (BECKOFF; SHERMAN, 2004).

Animais vertebrados possuem o nervo trigêmeo, que é o quinto par de nervos cranianos, que transmite informações somatossensoriais captadas pela região da cabeça e da boca e são transmitidas até o cérebro do animal (DONG,

1994; SILVER; FINGER, 1991). Nos peixes a pele que circunda a cabeça e a boca é innervada pelo sistema trigeminal, auxilia na informação visual e auditiva dos peixes.

Os receptores que detectam exclusivamente os estímulos nocivos são chamados de nociceptores. Estes receptores têm terminações nervosas livres e respondem principalmente a um estímulo nocivo como, por exemplo ao calor, a alta pressão mecânica e produtos químicos. Estudos anatômicos na cabeça de trutas arco íris revelaram a presença de muitas enervações pelo sistema trigeminal e observou-se a presença de alguns dos nociceptores polimodais de fibras Delta- A que atuam na dor imediata ou dor de uma picada e as fibras C que atuam nas dores crônicas (SNEDDON, 2002; SNEDDON, 2003). Em trutas arco íris os nociceptores polimodais de fibras Delta- A mais comumente foram encontrados em mucosas orais (TODA et al., 1997), músculo esquelético (KUMAZAWA; MIZUMURA, 1977), e órgãos viscerais (HAUPT et al., 1983). Estes pontos estão localizados em locais estratégicos no corpo dos peixes, para facilitar a estimulação mecânica, térmica e química do animal.

Esses estímulos geram efeitos adversos sobre o comportamento normal do animal, podendo despertar um componente psicológico que é indicativo de sofrimento, portanto um estímulo nocivo torna-se um dos melhores métodos para avaliar a dor em animais (BATESON, 1991). A Figura 3.1 mostra a localização dos nociceptores e receptores químicos na cabeça da truta arco íris.



FONTE: Sneddon et al. (2003).

Figura 3.1 Localização dos nociceptores e receptores químicos na cabeça da truta arco íris.

3.4. Estresse em peixes

O termo estresse tem sido utilizado amplamente e pode ser definido como a resposta fisiológica provocada quando um indivíduo percebe ameaça à sua homeostase. Segundo Moberg (1985) as respostas ao estresse podem ser divididas em três estágios gerais: o reconhecimento de um agente estressor, a defesa biológica contra o estressor e as consequências da resposta ao estresse. As consequências dessa resposta ao estresse irão determinar se o animal está sofrendo de aflição ou simplesmente passando por um breve episódio em sua vida que não terá impacto significativo sobre o seu bem-estar.

Os animais desenvolveram mecanismos para lidar com agentes estressores de curto prazo, como forma de sobrevivência, como escapar de um predador rapidamente. Entretanto ocorrem mudanças na função biológica que é importante para o bem-estar, por meio dela que podemos observar o impacto causado sobre o animal e torna-se a chave para a compreensão de que o estresse se tornou uma angústia, colocando o bem-estar de um animal em risco (MOBERG, 2000). Durante um rápido episódio de estresse o organismo utiliza os estoques de glicogênio, onde as catecolaminas secretadas durante o estresse convertem o glicogênio em glicose para ser utilizada em processos metabólicos necessários na gliconeogênese. Após o alívio do estresse, as reservas de glicogênio são rapidamente repostas pela gliconeogênese (MOBERG, 2000).

O estado de aflição gera o estado de estresse no peixe, o qual pode durar um longo período (crônico), ou ser breve (agudo). O estresse agudo ocorre quando o animal é submetido rapidamente a um único agente estressor e essa ação pode ser suficiente para perturbar e alterar as suas funções biológicas. Nesse caso o animal precisa desviar seus recursos biológicos específicos para outras funções biológicas (MOBERG, 2000).

Em sistemas de criação intensivos de peixes ocorrem várias práticas de manejo às quais os peixes serão submetidos, e que são consideradas estressantes, como a captura, o transporte, a densidade de estocagem, a interação social e a alimentação (URBINATI; CARNEIRO, 2004). Dentre todas

essas práticas de manejo, a captura é provavelmente uma das etapas mais agressivas quando se trata de manejo em pisciculturas e é caracterizada pelo seu caráter agudo, severo e de curta duração (URBINATI; CARNEIRO, 2004).

Além dessas etapas utilizadas no manejo de captura outros fatores empregados após a captura afetam diretamente o bem-estar animal, como um período de abstinência de alimentos para esvaziar o trato intestinal, o transporte dos animais até o local de abate, e o processo de insensibilização e o abate propriamente dito (HÄSTEIN et al., 2005).

3.5. Métodos de abate em peixes

A legislação brasileira não apresenta nenhuma lei que padroniza os métodos de abate específicos para peixes, visto que estes animais não se enquadram nas condições definidas para animais de açougue. Entretanto, uma vez que o animal será sacrificado para o consumo humano, deve-se garantir todas as condições humanitárias desde etapas de criação nas fazendas até o momento do manejo do pré-abate e do abate, realizando essas operações com bastante cautela, causando o mínimo de excitação e desconforto aos animais (MAPA, 2000).

Para promover o mínimo de excitação e desconforto aos animais, durante os procedimentos de abate, eles devem ser imediatamente conduzidos ao equipamento de insensibilização para garantir a indução e a manutenção dos animais em um estado de inconsciência, garantindo sua insensibilização até a operação de sangria, que deve ser realizada de forma rápida e completa evitando contusões mínimas na carcaça (MAPA, 2000).

A etapa de sangria é de grande importância para garantir a boa qualidade da carne no final do processamento. Em animais de sangue quente é observado durante a etapa da insensibilização, principalmente quando é executada com o choque elétrico, ocorre um considerável aumento da pressão sanguínea no corpo do animal, devido à aplicação da corrente. Os músculos se contraem e os capilares permanecem quase isentos de sangue. Consequentemente, os

músculos relaxam e essa pressão sanguínea precisa ser liberada pelo corte dos vasos, caso não ocorra essa sangria, o sangue é então empurrado novamente para os capilares com força suficiente para romper muitos deles e entrar no músculo do animal (LEET, et al., 1977).

Para obter-se uma carne com boa qualidade sensorial e com prolongada vida de prateleira torna-se necessário a remoção do máximo possível de sangue da carcaça, uma vez que ele pode causar aparência desagradável, além de ser um excelente meio de crescimento de microrganismos (WILLIAMS et al., 1983). Portanto a sangria deve ser realizada logo após o atordoamento, qualquer que seja o método empregado.

O abate consiste num processo composto por dois estágios, onde num primeiro o animal sofrerá algum tipo de insensibilização, para perder sua consciência e não sentir qualquer tipo de dor ou sofrimento. No segundo estágio o animal será morto por algum método de abate, dentre eles, a sangria, a parada cardíaca, ou a falta de oxigênio. Esse dois estágios devem ser executados de maneira rápida e precisa, enquanto o animal ainda esteja inconsciente (LINES et al., 2003).

Alguns estudos que avaliaram o estresse em peixes durante procedimentos de pré-abate e pós-abate demonstraram resultados negativos para a textura da carne devido o aumento da flacidez, além de reduzir a vida de prateleira do filé (BAHUAUD et al., 2010; LEFÈVRE et al., 2008). Animais que foram estressados antes do abate, apresentaram entrada precoce ao estado de rigor mortis, e observaram maiores perdas de peso por descongelamento, quando comparados com animais não estressados (BOGGESS et al., 1973; KIESSLING et al., 2004; MARX et al., 1997; ROTH et al., 2006). Dentre todos os tipos de métodos de abate que podem ser utilizados para os peixes. Os métodos que provocam muito sofrimento geralmente são aqueles que causam perda da consciência de maneira lenta (ROBB, 2001; ROBB e KESTIN, 2002).

A narcose por dióxido de carbono (CO_2) é utilizado para abates comerciais de diferentes animais como frangos, suínos e peixes como o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Este método é bastante utilizado em peixes, pela facilidade de dissolvê-lo na água, criando

uma mistura ácida que causa a insensibilização (CONLEE et al., 2005). À medida que ocorre a saturação desse gás na água, o pH começa a diminuir, e chega num ponto de estabilização, onde permanece em torno de 4,5 (ANON, 1995).

Estudos vêm sendo realizados testando esse método de insensibilização em peixes, e para algumas espécies como o salmão do Atlântico (*S. salar*) atordoado com dióxido de carbono, ocorreu a perda de consciência após 6 minutos de exposição do animal (ROBB et al., 2000). Outras espécies de peixes mais resistentes podem apresentar um comportamento de fuga mais prolongado antes da insensibilização, como enguias e esturjões que resistiram durante mais de uma hora (MARX et al., 1997). Carpas, trutas e enguias expostas ao CO₂ demonstraram grande produção de muco corporal, podendo ser um indicativo de que esse método pode ser altamente estressante para esses peixes (MARX et al., 1997).

Salmão do Atlântico (*S. salar*) atordoado com CO₂ apresentou menor capacidade de retenção de água (KIESSLING et al., 2004) maiores perdas de água por descongelamento (ROTH et al., 2006) e a textura dos seus filés estava pouco rígida (ROTH et al., 2002). Esses fatores podem ter ocorrido devido algum tipo de estresse sofrido em função do método de atordoamento escolhido. Outro estudo com o robalo (*Dicentrarchus labrax*), comparando métodos de atordoamento, asfixia em gelo e CO₂, apresentam resultados semelhantes entre si, entretanto notou-se um desempenho um pouco melhor para o CO₂ em resposta ao estresse apresentando menores níveis de lactato e cortisol (LAMBOOIJ et al., 2006a).

Outra técnica que vem sendo estudada recentemente para insensibilizar os peixes é a narcose por monóxido de carbono (CO), na qual esse gás é supersaturado na água. Uma análise comportamental realizada com salmão do Atlântico (*S. salar*) em imersão na água saturada por monóxido de carbono durante 8 a 10 min, mostrou que os peixes apresentaram natação errática, convulsões e movimentos circulares próximos a superfície antes de estarem totalmente sedados. Apresentaram uma entrada mais precoce no *rigor mortis*, e

valores de pH musculares bastante ácidos e muitas perdas por descongelamento no músculo após a filetagem (CONCOLLATO et al., 2014).

O método de asfixia onde o animal é retirado da água e exposto ao ar, até o momento de sua morte, é considerado um dos métodos de abate mais estressantes quando comparados a métodos que utilizam a insensibilização e a sangria (ERIKSON et al., 1997; OTTERA et al., 2001). A asfixia utilizada como tratamento controle em um experimento com o robalo (*D. labrax*) revelou-se ser um procedimento bastante estressante devido ao prolongamento dos indicadores de estresse fisiológico (POLI et al., 2005); os resultados confirmam que a asfixia provoca alta resposta ao estresse, os níveis de cortisol avaliados aumentaram cinco vezes mais em relação à asfixia com gelo e saturação por CO₂ (LAMBOOIJ et al., 2006b).

A imersão dos peixes em água e gelo é um método que reduz rapidamente a temperatura corporal dos peixes. Quando isso ocorre, há uma redução da atividade muscular tornando-se aparentemente paralisado pelo frio, o que é importante para garantir a qualidade da carne e prolongar a vida de prateleira. Durante o armazenamento resfriado, o pescado apresenta autólise reduzida. Nesse método os peixes morrem por anóxia, através da água gelada que resulta num colapso das suas brânquias (SKJERVOLD et al., 2002).

Este método de abate é comumente utilizado para algumas espécies cultivadas, como a truta arco-íris (*O. mykiss*) que exposta à temperatura de 2°C, demora em torno de 9,6 min para perder a função cerebral (KESTIN et al., 1991). A dourada (*Sparus auratus*) e o catfish em temperaturas de 0 a 0,1°C perderam a consciência entre 5 a 12 min após a exposição (ROBB; KESTIN, 2002; SMART, 2002).

O atordoamento por percussão craniana é realizado com a aplicação de um golpe na cabeça do animal, o que resulta, quando bem aplicado, na interrupção permanente dos processos neurais causando a morte. Este tipo de atordoamento tem sido utilizado principalmente em peixes de grande porte, como o salmão do Atlântico (ROBB, 2008). Aos métodos de insensibilização aplicados em linguado (*Scophthalmus maximus*), o método de percussão

craniana foi o tratamento ideal para garantir a qualidade da carne desta espécie (ROTH et al., 2007).

A eletronarcose é um método que pode ser utilizado para atordoar grandes lotes de peixes. Neste método, a eletricidade afeta a funcionalidade dos nervos, que repassa as informações para o cérebro, o qual irá processá-la, causando a confusão das informações e consequentemente a perda de consciência dos animais (LAMARQUE, 1990). Entretanto, quando não aplicada corretamente, a eletricidade pode provocar a paralisia muscular, sem que ocorra a insensibilização. Vários estudos relatam que a eletronarcose é aplicada em salmão do Atlântico (*S. salar*), truta arco-íris (*O. mykiss*) (EFSA, 2009).

Trabalhos testando diferentes métodos de insensibilização em linguado (*S. maximus*), com o choque elétrico a 5Hz e 80Hz utilizando corrente contínua demonstrou ser um bom método, porque não ocorreu nenhum tipo de lesão na coluna vertebral ou hematomas no músculo (ROTH et al., 2007). O atordoamento elétrico é um método que executa insensibilização do animal de acordo com princípios do bem-estar animal. Deste modo, é considerado um dos métodos de abate mais rápidos e eficientes para atordoar ou matar os animais (LINES et al., 2003; VAN DE VIS et al., 2003; LAMBOOIJ et al., 2006a), além de causar menor estresse.

O atordoamento elétrico pode ser realizado com lotes de peixes e não necessita retirá-los da água (LAMBOOIJ et al., 2006a). Este método é praticado com sucesso em animais de criação como ovinos, suínos e aves. É um processo onde ocorre a passagem da corrente elétrica através do corpo do animal e estimula todas as regiões do cérebro, resultando em um insulto epileptiforme generalizado, onde o animal torna-se incapaz de responder aos estímulos nervosos (KOOI et al., 1978; LOPEZ DA SILVA, 1983). Em carpa comum (*Cyprinus carpio*) o atordoamento realizado com corrente de 0,73 A e uma voltagem de 411 V e frequência de 50 Hz, corrente alternada, condutividade de 330 mS durante 5s combinados com água gelada, demonstrou ser um método eficaz para a prática de abate (LAMBOOIJ et al., 2007).

Muitos estudos sobre os métodos de abate e seus efeitos comportamentais têm sido realizados pela comunidade Européia. Estudos

realizados com enguias vivas (*A. anguilla*) submetidas ao resfriamento apresentaram elevado grau de estresse, pois os animais apresentaram movimentos vigorosos e batimentos cardíacos irregulares (LAMBOOIJ et al., 2002a). Os mesmos autores verificaram em bagre africano (*C. gariepinus*) utilizando o mesmo método, que os peixes levaram em torno de 5 minutos para iniciar a perda de consciência (LAMBOOIJ et al., 2006b). Os efeitos do pré-abate realizados em trutas arco-íris (*O. mykiss*), cultivadas em gaiolas, realizados logo após a captura, após o transporte, e após a captura por bombeamento e abate por eletronarcose, mostraram que o estresse causado por esses métodos afetou a qualidade da carne, observado através dos níveis de cortisol, lactato, pH e rigor mortis (MERKIN et al., 2010).

Embora o atordoamento elétrico seja recomendado e utilizado em peixes de vários países europeus, alguns cuidados em relação aos ajustes dos parâmetros devem ser realizados durante a aplicação de eletricidade. Entre eles pode-se citar o tipo de corrente (AC - alternada, DC - contínua), a frequência da corrente e intensidade do campo elétrico e o tempo de exposição (ROTH et al., 2004; LINES; KESTIN, 2005), para evitar possíveis hemorragias no músculo devido ao forte estímulo elétrico (HAUCK, 1949) podendo assim, comprometer a qualidade do produto final (ROBB; ROTH, 2003; LINES; KESTIN, 2004; POLI et al., 2005).

O salmão do Atlântico submetido a uma intensidade elétrica muito prolongada apresentou efeito negativo na qualidade do músculo, devido à intensa glicólise anaeróbia associada ao estresse (KIESSLING et al., 2004). No entanto, o uso de eletricidade para estimular o metabolismo anaeróbico é uma ferramenta interessante para compreender os mecanismos envolvidos no amolecimento da carne. A estimulação elétrica no músculo provoca um rápido esgotamento da energia como o ATP e creatina fosfato (CHIBA et al., 1990), causando redução do pH e o rápido desenvolvimento do rigor mortis (JERRETT et al., 1996; FLETCHER et al., 1997; JERRETT; HOLLAND, 1998).

Peixes que sofrem estímulos elétricos iniciaram o rigor mortis mais precocemente e apresentaram ligeira perda da força de cisalhamento do músculo. Entretanto os autores não encontraram evidências da degradação

estrutural, perda de água ou quaisquer alterações dos atributos sensoriais, exceto para a coloração (MORZEL et al., 2003). Como os músculos respondem de formas diferentes as diferentes frequências elétricas (BAGSHAW, 1982), ainda torna-se uma incerteza explicar como esse parâmetro afeta a qualidade da carne.

Trutas arco-íris (*O. mykiss*), expostas a um campo elétrico de 250V com frequência de 1000 Hz por 60 segundos demonstraram ser uma boa condição para garantir o abate humanitário desta espécie, uma vez que foi observado a perda instantânea dos reflexos (LINES et al., 2003). Na Oceania os peixes são anestesiados com isoeugenol antes do abate (ROBB; KESTIN, 2002), entretanto o uso desta técnica em alguns países europeus é vetado devido à consequência de ser introduzido um novo medicamento na água e ter implicações no mercado consumidor (LINES et al., 2003). Países europeus vêm buscando adequações em abates de peixes, como no Reino Unido onde a preocupação com o bem-estar em trutas tem aumentado drasticamente nos últimos anos, devido às exigências do mercado consumidor em adquirir peixes cultivados e abatidos de maneira humanitária (LINES et al., 2003).

3.6. Indicadores físico-químicos para avaliação do pescado

O consumidor de pescado esta cada dia mais exigente, indo ao encontro de um alimento saudável para o consumo, porém demonstrando grande interesse na forma como esse produto chega até a sua mesa, desde etapas de cultivo, até o processamento da carne. Alguns aspectos intrigam os consumidores como a espécie do pescado, local de origem, tempo de captura e despesca, tamanho, cor, textura e principalmente o frescor (SANTOS, 2011).

De forma geral os consumidores estão sempre buscando o pescado mais fresco possível, entretanto há grande falta de informação das principais espécies de peixes de valor comercial no Brasil, sobre os aspectos de deterioração e de sua vida útil quando armazenados no gelo. Logo é de suma importância realizar um estudo para cada espécie sobre os parâmetros físicos, sensoriais, químicos

e microbiológicos associados ao frescor e a perda das características desejáveis (SANTOS, 2011).

O processo de deterioração do pescado é bastante rápido e complexo, portanto é necessário utilizar uma combinação de várias análises para determinar a qualidade do pescado de forma criteriosa (OGAWA e MAIA, 1999). É importante realizar uma avaliação utilizando métodos sensoriais, que apesar de serem bastante antigos são muito úteis para avaliar a qualidade do pescado.

Os métodos físicos são importantes para relatar as mudanças que ocorrem nas propriedades físicas do músculo, como pH, tensão das fibras musculares, propriedades elétricas, dureza do músculo, viscosidade do suco extraído da carne. Métodos químicos são eficientes para avaliar as mudanças que são difíceis de distinguir, como a atividade microbiana ou enzimática. São medidos pelas bases nitrogenadas voláteis (BNV), hipoxantina (Hx), valor de (K), sendo um parâmetro utilizado para medir o frescor em peixes, baseado em alterações autolíticas no músculo. Avaliação microbiológica e métodos histológicos que indicam o grau ou taxa de destruição das miofibrilas (OGAWA e MAIA, 1999), também são importantes.

3.6.1. Análises microbiológicas

O pescado é um alimento altamente perecível, decorrente dos fatores microbiológicos, da rápida instalação da fase de rigidez pós-morte, da liberação do muco, da alta quantidade de água nos tecidos, constituição do tecido conjuntivo e do tecido rico em proteínas, fofolípídeos e ácidos graxos. Logo após sua morte, o pescado sofre uma série de alterações pela ação de enzimas musculares que hidrolisam proteínas e lipídeos e na sequência inicia-se a degradação microbiana que provoca alterações químicas e físicas gradativas e irreversíveis (VIEIRA, 2011).

Essa degradação microbiana inicia-se normalmente após a etapa do rigor mortis (fase de rigidez), onde o pH da carne já não se encontra tão ácido e os microrganismos atuam no tecido. Utilizam os aminoácidos e outras substâncias

não protéicas, então ocorre o desenvolvimento seletivo de algumas bactérias que transformam esses compostos em aromas desagradáveis. Como resultado há um aumento na decomposição dos produtos dos aminoácidos em bases, compostos voláteis, H₂S, o que ajuda a acelerar a decomposição do pescado (VIEIRA, 2011).

Bactérias contaminantes no pescado:

- 3.6.1.1 Microrganismos deteriorantes: apresentam a temperatura ótima de crescimento em condições ambientais ou de refrigeração, como as bactérias psicotróficas.
- 3.6.1.2 Microrganismos indicadores de higiene: são utilizados para avaliar as condições higiênicas, enquadram-se as bactérias mesófilas, coliformes totais e bolores e leveduras em pescados processados.
- 3.6.1.3 Microrganismos indicadores de contaminação fecal: são os coliformes termotolerantes com destaque para a *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Enterococcus faecalis*.
- 3.6.1.4 Microrganismos indicadores de manipulação inadequada: indicadores de possíveis falhas nos pontos críticos de controle, um exemplo bem conhecido é a bactéria mesófila *Staphylococcus aureus*, que em condições adequadas produz uma exotoxina (VIEIRA, 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária utiliza a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, do regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para o pescado “in natura” resfriados ou congelados para o consumo humano. Define ausência de *Salmonella* em 25g de amostra e tolerância máxima para *Staphylococcus coagulase positiva* de 10³ UFC/g (ANVISA, 2001).

3.6.2. Rigor Mortis

O estado de rigor mortis é definido como sendo a perda da plasticidade e extensibilidade dos músculos devido a alterações ocorridas no ciclo de acoplamento e desacoplamento dos filamentos finos (actina) sobre os filamentos

grossos (miosina) o que produz a contração e relaxamento dos sarcômeros (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994). A fase de pré-rigor mortis é a fase compreendida entre a morte do animal e o início da contração muscular (TAVARES; GONÇALVES, 2011), onde o músculo encontra-se ainda flexível e responde a estímulos elétricos. A duração dessa fase irá depender das reservas de ATP e glicogênio no momento da morte do animal. Nesta fase os animais apresentam suas defesas naturais ainda intactas, com o pH ligeiramente ácido que inibe o desenvolvimento de microrganismos e ação de enzimas endógenas (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994).

O rigor mortis pleno é iniciado imediatamente após a sangria, onde ocorre a interrupção do fornecimento de oxigênio e nutrientes para os músculos (LAWRIE, 2005). A célula muscular continua com a sua atividade, na tentativa de adaptar-se à falta de oxigênio e a redução da reserva energética o ATP (adenosina trifosfato) (ORDÓÑEZ, 2005). Logo com a interrupção de oxigênio o ATP é hidrolisado de forma contínua até esgotar-se totalmente, direcionando a produção de energia através da degradação do glicogênio muscular numa sequência de reações enzimáticas que ocorre de forma anaeróbica. A redução da taxa de ATP, de glicogênio e o acúmulo de ácido láctico, promovem o decréscimo gradativo do pH no músculo (PRATES 2000; CONTRERAS-GUSMÁN, 1994).

O enrijecimento do músculo ocorre devido à contração extrema e irreversível de suas fibras. Esse estado sofre influência de vários fatores, como o método de abate, a reserva de glicogênio, pH e a temperatura de conservação do músculo (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994). Nos músculos de animais que apresentam maior quantidade de fibras brancas, ocorre intensa atividade anaeróbica, portanto a glicólise e a degradação do ATP são mais rápidas, quando comparadas a fibras vermelhas (ORDÓÑEZ, 2005).

Peixes armazenados refrigerados em gelo logo após seu abate, em torno de 0 a 5°C apresentam entrada no rigor mortis entre 1 a 7 horas (DEBARRET-LADRAT et al., 2006). ROTH et al. (2002) encontraram diferenças no *rigor mortis* entre peixes insensibilizados por CO₂, eletricidade e percussão craniana. O estresse causado durante a insensibilização por CO₂ antecipou o início e o

término do estado de rigor, acelerando o amaciamento do tecido muscular pós-morte e, conseqüentemente, o processo de decomposição da carne, em relação aos outros tratamentos.

No pós-rigor mortis o músculo que estava rígido durante um período, torna-se macio através da descontração e recuperação da sua elasticidade muscular e recupera muitas propriedades da fase de pré-rigor mortis (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994). O resfriamento da carne no período de pós-morte é relevante para a microestrutura e característica da carne, como a maciez, a capacidade de retenção de água e a cor (ZAMORA et al., 1996).

3.6.3. Capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água na carne é um atributo bastante importante, porque é através desta propriedade que podemos verificar a intensidade com que a carne consegue armazenar e manter o seu conteúdo aquoso.

A exsudação da carne pode ocorrer, devido à compressão, o impacto, cisalhamento, congelamento e o cozimento (ORDÓÑEZ, 2005). As variáveis quantitativas da carne, como a coloração, textura, pH e capacidade de retenção de água, solubilidade e funcionalidade das proteínas sofrem influência direta do estresse pré abate (BARBUT, 1998).

3.6.4. Perdas por cozimento e por exsudação

A suculência da carne é determinada através das perdas de líquidos que ocorrem durante o cozimento, caracterizando a intensidade de liberação do suco da carne. É um fator de suma importância, pois contribui para a aceitação da textura da carne e também a outros parâmetros associados à qualidade da carne (PRICE; SCHWIEGERT, 1994). O cozimento produz mudanças

importantes nos componentes musculares como a água, fibras musculares, tecidos conjuntivos e adiposos (AYALA et al., 2005).

O líquido exsudado pela carne no descongelamento é chamado de “drip” (OGAWA e MAIA, 1999). No momento do congelamento o fluído intracelular transpassa a membrana e se mistura com o fluído extracelular e sofre o congelamento (DAMEZ et al., 2008). Quando ocorre o descongelamento essa água é novamente reabsorvida pelas proteínas dentro da célula, e o músculo volta a recuperar o seu formato original. Entretanto com o avanço da desnaturação proteica, a proteína vai perdendo essa capacidade de hidratação e assim aumenta gradativamente as perdas pela formação de “drip” (OGAWA e MAIA, 1999). Alguns fatores podem afetar a perda de água no músculo como a velocidade do congelamento (CHEVALIER et al., 1999; EINEN et al., 2002), a temperatura e o tempo de armazenamento (CAPPELN; JESSEN, 2001), a velocidade e método de descongelamento aplicado (TOLDRA, 2003). Assim de igual forma, o tempo de filetagem e de congelamento estão relacionados ao estado de rigor mortis (EINEN et al., 2002).

3.6.5. Potencial hidrogeniônico (pH)

A determinação do pH representa um parâmetro importante para monitorar a qualidade de carnes, bem como o pescado (BYRNE et al., 2000). O Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal estabelece limites máximos para o pH da parte interna do pescado fresco de 6,50 e na parte externa do músculo deve ser inferior a 6,85 (RIISPOA, 2001). O pH final da carne é dependente do teor de glicogênio presente no músculo, além de influenciar decisivamente na capacidade de retenção de água (YUE et al., 2004).

Estudos com diferentes técnicas de captura demonstraram que os peixes que permaneceram expostos ao ar e se debateram no momento da captura apresentaram pH de 6,88 para o robalo (PARISI et al., 2002) e 6,7 para o salmão do Atlântico (ERIKSON et al., 1997). MORZEL et al (2003) realizaram abates em linguado (*S. maximus*) e constataram que o método de percussão

craniana apresentou valor de pH significativamente mais elevado (7,5) imediatamente após o abate, em relação ao choque elétrico (6,8). No entanto, depois de 48 horas observou-se redução de pH para 6,5 e 6,7, respectivamente. O aumento do pH nas fases posteriores ao armazenamento, são indicadores clássicos de estresse no momento do abate, em muitas espécies de animais, incluindo peixes. Portanto o pH inicial mais ácido está associado com o estresse *ante mortem* como descrevem vários autores para salmonídeos (AZAM et al, 1989; ERIKSON et al., 1997; THOMAS et al., 1999), atum (SIKORSKI et al., 1990) e enguia (VAN de VIS et al., 2001; MARX et al., 1997).

3.6.6. Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV)

As Bases Nitrogenadas Voláteis correspondem a um grupo de compostos como a amônia, trimetilamina, dimetilamina e traços de monometilamina, propilamina (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994). No início das etapas de degradação a base volátil mais representativa é a amônia originária dos produtos da desaminação dos derivados do ATP. À medida que ocorre a degradação de outros compostos nitrogenados, iniciam a liberação de amônia (OGAWA e MAIA, 1999). O estado de frescor nos peixes pode ser estimado de acordo com os índices de BNV no músculo, que são classificados de acordo com Ogawa e Maya (1999), de 5 a 10 mgN/100g (excelente estado de frescor), 15 a 25 mgN/100g (razoável frescor), 30 a 40mgN/100g (início da putrefação) e 50mgN/100g (muito deteriorado). A Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece que o valor limite máximo de BNV de 30 mg N/100g⁻¹ para pescado fresco, exceto elasmobrânquios (MAPA, 1997).

3.6.7. Oxidação de lipídios em peixes

A rancidez oxidativa ocorre particularmente em peixes gordos, e é considerada deterioração bastante complexa. Inicialmente o oxigênio reage com

os lipídeos insaturados formando hidroperóxidos, que se decompõem em substâncias que conferem o sabor característico de ranço. Ela pode ser medida através de duas análises químicas, onde num primeiro estágio utiliza-se o índice de peróxido e num segundo o TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

As alterações que ocorrem com a oxidação da gordura na carne estão relacionadas com características intrínsecas do alimento, bem como condições do ambiente onde ocorreu o processamento, principalmente em relação à temperatura (FERREIRA, 1999). De acordo com OGAWA e MAIA (1999) sabor e odor de ranço em peixes ocorrem quando o índice de peróxido está acima de 10 a 20 micromoles de hidroperóxido e para TBARS, acima de 1 e 2 micromoles de malonaldeído.) Os produtos cárneos com índice de TBARS inferiores a 1,0 mg/malonaldeído/kg, geralmente não apresentam sabores e odores residuais do ranço característico da oxidação lipídica (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2002).

3.6.8. Medida dielétrica (*Fish Freshness Meter*)

A medida da impedância elétrica é uma técnica rápida, direta, efetiva, sendo utilizada por diversos pesquisadores como uma das técnicas para avaliar características físicas, químicas e biológicas (BERTOTTI, 2010). As mudanças que ocorrem nas propriedades elétricas do tecido animal pós-morte têm grande importância na avaliação da qualidade da carne, especialmente na maciez (BERTOTTI, 2010). Durante o estado de pré-rigor a impedância elétrica do músculo decresce rapidamente, e quando o músculo entra no estado de pós-rigor ela continua decrescendo de forma mais lenta (LEPETIT et al., 2002).

Uma questão importante que deve ser levada em consideração é que a carne é eletricamente anisotrópica, isso significa que suas propriedades elétricas mudam de acordo com a direção do campo elétrico aplicado e com a frequência, portanto a escolha do local para realizar a medição deve levar em conta a orientação das fibras musculares e se elas estão alongadas ou contraídas SWATLAND (1997).

Byrne et al. (2000), determinaram as medidas de impedância elétrica na carne de bovinos e observaram que essas medidas apresentam uma correlação com as características de qualidade da carne. A associação da degradação da membrana celular pode ocorrer pelo fato de que parte do fluído intracelular passa para o meio extracelular, aumentando a condutividade. Rubensam (2000) observou que a impedância da carne tem uma elevada correlação com o pH nas primeiras 24h.

3.6.9. Desnaturação protéica (DSC)

É uma técnica de caracterização do material através da medição de temperatura e fluxos de calor associados com a transição do material e determina a tolerância dos extremos de temperatura utilizados para desnaturar as proteínas. A transição térmica ocorre quando é aplicado o calor e resulta na desnaturação da molécula de proteína. Muitos alimentos sofrem diversos tratamentos térmicos durante seu transporte, processamento e preparação, como a refrigeração, congelamento, pasteurização, defumação etc. Estes tratamentos resultam em mudanças das propriedades físico-químicas, logo haverá um significativo impacto na qualidade do produto final (BOYE et al., 2004).

PARK e LANIER (1989) investigando a desnaturação proteica em filés de tilápia (*O. aureus*) observaram que a miosina sofreu desnaturação a temperatura de 58,3°C e para a actina 78,6°C. MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL (2000) para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) encontraram valores de desnaturação da miosina (54,4°C) e da actina (75,9°C).

Estudos de desnaturação proteica com o filé de linguado (*S. maximus*) demonstraram que a desnaturação da miosina ocorreu a 45,2°C e da actina a 71°C (CHEVALIER et al., 2001). O peixe fresco requer maior quantidade de energia para desnaturar totalmente as proteínas em relação ao peixe congelado, o que implica que o processo de congelamento desnatura algumas proteínas

musculares, provavelmente devido à formação de cristais de gelo (BADII e HOWELL, 2002).

3.6.10. *Degradação do ATP e seus catabólitos*

A degradação do ATP ocorre após a morte do pescado quando todas as reservas de fósforo terminam e o ATP não pode mais ser regenerado, e segue uma rota degenerativa regulada por enzimas do tecido muscular (TAVARES; GONÇALVES, 2011). Inicia-se o processo de degradação dos nucleotídeos, que ocorre de maneira concomitante e interligada com a evolução do glicogênio. O pH muscular encontra-se ácido o que irá inibir ou catalisar algumas enzimas, e interferir nas mudanças que irão ocorrer no músculo (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994). Têm sido propostos dois mecanismos de degradação do ATP em peixes como mostra a Figura 3.2.

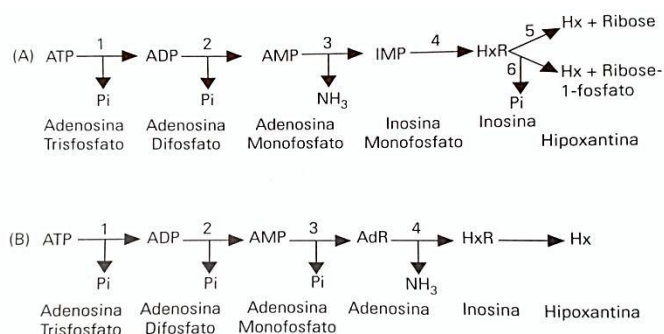


Figura 3.2 Mecanismos de degradação do ATP.

A sequência degradativa nos dois mecanismos inicia-se com a perda do fosfato terminal do ATP até formar o AMP. A reação ATP até IMP é rápida e pode ocorrer antes que o pH muscular torne-se constante. A passagem do IMP para HxR e depois Hx é mais lenta e pode variar de acordo com a espécie e condições de estocagem. A hipoxantina (Hx) é o último derivado do ATP e um dos mais pesquisados tanto nos mecanismos bioquímicos quanto biológicos, por ser um indicador de frescor em pescados in natura, ou seja, apenas nos

primeiros momentos do armazenamento (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994; TAVARES; GONÇALVES, 2011).

Outro indicador de frescor em pescados é o valor K, que mede a extensão da quebra do ATP. Baseia-se na determinação de compostos resultantes da degradação do ATP (ADP, AMP, IMP, inosina e hipoxantina). Quando o valor K é menor que 5%, de maneira geral indica que o pescado está muito fresco, valores K entre 5% e 20%, indicam que o pescado ainda está fresco e pode ser consumido, os valores K entre 20% e 60% indicam que o pescado deve ser submetido à cocção antes de ser consumido ou processado e valores K entre 60% e 80% indicam sinais de putrefação (CONTRERAS-GUSMÁN 1994; HAARD, 2002; OGAWA e MAIA 1999).

3.6.11. Cor Instrumental

A coloração da carne é um dos principais fatores que afeta a sua comercialização, uma vez que o consumidor utiliza esse atributo sensorial para avaliar a sua qualidade. A CIE (Commission International de l'Eclairage) define a cor como sendo o atributo visual que compõem uma combinação de conteúdos cromáticos e acromáticos e não depende somente da cor física do alimento, mas também do seu tamanho, forma e estrutura (CAÑEQUE e SAÑUDO, 2000).

Alguns fatores intrínsecos podem afetar os pigmentos do músculo, como a espécie, a idade, sexo e tipo de alimentação. Condições de pré e pós-abate também podem modificar a aparência da cor, como o estresse, a temperatura da câmara frigorífica pode reduzir o pH, e processos de oxidação e oxigenação (CAÑEQUE e SAÑUDO, 2000). TUCKEY et al. (2012) demonstram em seu estudo com pargo (*P. auratus*), que a análise da cor é uma poderosa ferramenta, para monitorar o *status* metabólico dos tecidos apresentando uma forte correlação com a bioquímica muscular. A avaliação simples da cor do músculo pode ser suficiente para determinar o estado bioquímico dos peixes pós-morte. Esta técnica pode ser amplamente utilizada em indústrias de processamento de pescado como ferramenta no controle de qualidade.

3.6.12. *Textura Instrumental*

A textura da carne é determinada por propriedades das estruturas miofibrilares, conjuntivas e do citoesqueleto, e são muito variáveis dependendo da espécie, sexo, idade e as variáveis biológicas e tecnológicas (CAÑEQUE e SAÑUDO, 2000).

A textura da carne pode ser avaliada por métodos subjetivos que são testes realizados pelos consumidores, ou por testes objetivos em que se enquadram os mecânicos (corte, compressão, penetração) e os estruturais e químicos (ultrassom, fluorescência) (CAÑEQUE e SAÑUDO, 2000). A textura é definida como sendo a força necessária para provocar ruptura do tecido (colapso da estrutura 3D) ou clivagem dos filamentos musculares. Efeitos do estresse pré-abate em peixes tem afetado as propriedades de amaciamento e da textura (LOVE, 1988). A firmeza da carne é uma característica sensorial bastante valorizada para os consumidores, sendo também um atributo importante no momento de executar o processamento dos filés pelas indústrias (DUNAJSKI, 1979; HAARD, 2002).

3.6.13. *Análise Sensorial*

A análise sensorial é definida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993) como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais, como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. É considerado um dos métodos mais antigos e confiáveis para avaliar o estado de frescor no pescado. Largamente empregado em indústrias de processamento do pescado para garantir a inspeção e o controle de qualidade. Sua rápida e fácil execução permite avaliar vários lotes de matéria-prima e do produto acabado num curto espaço de tempo (SANT'ANA; FREITAS, 2011).

Como a análise sensorial é um método subjetivo, ela pode ser influenciada por vários fatores externos que cercam o local da avaliação.

Portanto as informações da análise sensorial devem ser somadas aos dados obtidos pelas análises físico-químicas e microbiológicas, para completar os dados sobre a qualidade do produto (SANT' ANA, 2011).

Alguns métodos são largamente utilizados para avaliar o frescor em peixes, como a escala "Torry", um método pioneiro que utiliza quatro sentidos (visão, olfato, paladar e tato) (TERRY RESEARCH STATION, 1989). O esquema proposto pela União Europeia (EU) utiliza uma escala de qualidade, que estabelece o grau de frescor para espécies de peixes economicamente importantes, além de crustáceos e lulas (NUNES et al., 2007). O método do índice de Qualidade (MIQ) propõe a avaliação sensorial individual para cada espécie de peixe, levando em conta que cada espécie apresenta diversas formas de demonstrar seus indicadores de deterioração (HYLDING et al., 2007).

O bem-estar em peixes, bem como o efeito de métodos de abate sobre a qualidade da carne ainda é um assunto que apesar de ser relevante, é ainda pouco difundido no Brasil. Mais estudos devem ser realizados como forma de proporcionar protocolos que garantam o bem estar aos peixes no momento do abate, assim como já existe para mamíferos e aves.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de diferentes métodos de insensibilização aplicados em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando a eletronarcose, choque térmico e o controle com anestésico e seus efeitos sobre as alterações na qualidade da carne resfriada e congelada.

4.1. Objetivos específicos

- a) Verificar o efeito da insensibilização por eletronarcose e avaliar as variáveis comportamentais, resposta aos estímulos e reflexos clínicos, para selecionar os melhores parâmetros elétricos.
- b) Avaliar o efeito de diferentes métodos de insensibilização (choque térmico, eletronarcose e o controle com anestésico) em tilápia do Nilo resfriadas a 4°C e estocadas por 25 dias através dos parâmetros indicadores de qualidade da carne; físicos, químicos, microbiológicos e sensoriais.
- c) Avaliar os diferentes métodos de insensibilização (choque térmico, eletronarcose e o controle com anestésico) através dos parâmetros indicadores da qualidade dos filés de tilápia do Nilo congelados a -40°C e estocados durante 180 dias a -18°C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - **ABNT** - **NBR 12806**:
Análise sensorial dos alimentos e bebidas. São Paulo, p.8, 1993.

ANON. **Operating manual for the product certification schemes for Scottish quality farmed salmon and smoked Scottish salmon**. Inverness: Scottish Quality Salmon Ltd, 1995.

AYALA, M.D., ALBORS, O.L., BLANCO, A., ALCAZAR, A.G., ABELLAN, E., ZARZOSA, G.R., GIL, F. Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, (*Dicentrarchus labrax* L), after cooking and freezing. **Aquaculture**, v. 250, p.215–231, 2005.

AZAM K., MACKIE, I.M., SMITH, J. The effect of slaughter method on the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during storage on ice. **International Journal Food Science and Technology**, v. 24, p. 69–79, 1989.

BADII, F., E HOWELL, N. K. Changes in the texture and structure of cod and haddock @ fillets during frozen storage. **Food Hydrocolloids** v.16, p.313–319, 2002.

BAGSHAW, C.R. Muscle contraction. In: CHAPMAN e HALL. **Outline studies in biology**. London, 1982, 79p.

BAHUAUD, D., MØRKØRE, T., ØSTBYE, T.K., VEISETH-KENT, E., THOMASSEN, M.S., OFSTAD, R., VEISETH-KENT, E., THOMASSEN, M.S., OFSTAD, R. Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) pre- and post-rigor fillets exposed to short and long-term crowding stress. **Food Chemistry**, v.118, p. 602–615, 2010.

BARBUT, S. Estimating the magnitude of the PSE problem in poultry. **Journal Muscle Foods**, v.9, p.35-49, 1998.

BATESON, P. Assessment of pain in animals. **Animal Behaviour**, v.42, p.827–839, 1991.

BECKOFF, M., SHERMAN, P.W. Reflections on animal selves. **Trends in Ecology and Evolution**, v.19, p. 176–80, 2004.

BERTOTTI, F.L. **Sistema de biotelemetria passiva e técnica de medição para aquisição da impedância elétrica de tecido animal “post mortem”**. 2010.

- 174f. Tese (Doutorado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BLANCK, D. V. **Polimorfismo no íntron 1-PstI do gene do hormônio do crescimento em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 141p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- BOGGESS Jr., T.S., HEATON, E.K., SHEWFELT, A.L., PARVIN, D.W., Techniques for stunning channel catfish and their effects on product quality. **Journal of Food Science**, v.38, p. 1190–1193, 1973.
- BOYE, JOYCE I., CHING Y. MA, ASHRAF I. Thermal stability of β -lactoglobulins A and B: effect of SDS, urea, cysteine and N-ethylmaleimide. **Journal of dairy research** v.71.02. p.207-215, 2004.
- BRAITHWAITE, V. A. Cognitive ability in fish. In: SLOMAN, K.A; WILSON, R.W., BALSHIME, S. **Behavior and Physiology of fish**. Gulf Professional Publishing, 2006. Cap. 1, p. 1- 29.
- BRASIL. **Portaria 185**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 1997. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 21 de agosto de 2014.
- BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (**RIISPOA**), pescados e derivados 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda>>. Acesso em 10 agosto de 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2001. **Resolução RDC n. 12**, de 02 de janeiro de 2001 – Diário Oficial da União 10 de janeiro de 2001, seção 1.
- BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-estar animal: conceitos e questões relacionadas – Revisão. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.1-11, 2004.
- BYRNE. C.E; TROY. D.J; BUCKLEY. D.J. Post mortem changes in muscle electrical properties of bovine (*M. longissimus dorsi*) and their relationship to meat quality attributes and pH fall. **Meat Science**, v.54 p.23-34, 2000.
- CAÑEQUE, V.; SAÑUDO, C. **Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes**. Madrid: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología y Alimentaria, 2000.
- CAPPELN, G., JESSEN, F. Glycolysis and ATP degradation in cod (*Gadus morhua*) at subzero temperatures in relation to thaw rigor. **LWT- Food Science and Technology**, v. 34, p.81–88, 2001.

- CHEVALIER, D., BAIL, A. L.E., GHOU, 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.
- CHEVALIER, D., LE BAIL, A., CHOUROT, J.M., CHANTREAU, P. High pressure thawing of fish (whiting): influence of the process parameters on drip losses. **LWT-Food Science and Technology**, v. 32, p. 25–31, 1999.
- CHIBA, A., HAMAGUCHI, M., KOSAKA, M., ASAI, T., TOKUNO, T., CHICHIBU, S., In vivo ^{31}P - NMR analysis of the electric anesthetized loach, (*Cobitis biswae*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.97A, p.385–389, 1990.
- CIE - Commission Internationale de l'éclairage. **Recommendations on uniform colourspaces–colour equations, psychometric colour terms**. Paris : n.2 to CIE Publ. n.15 (E-1.3.L) 1971/9TC-1- 3, 1978.
- CONCOLLATO, A., PARISI, G., OLSEN, R.E., KVAMME, B.O., SLINDE, E., ZOTTE, A.D. Effect of carbon monoxide for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) slaughtering on stress response and fillet shelf life. **Aquaculture**, v.433 13–18, 2014.
- CONLEE, K.M., STEPHENS, M.L., ROWAN, A.N., KING, L.A. Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. **Laboratory Animals**, v. 39, p.137–161, 2005.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994, 409p.
- COSTA, A.N., MOLENTO, C.F.M., PINTO, L.F.B., TEIXEIRA, M.W., PALHA, M.D.C., PAIXÃO, R.L.A. A declaração de Cambridge sobre a consciência dos animais humanos e não humanos. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**. Ano XIX, n.59, p. 8-9, 2013.
- DAMEZ, J., CLERJON, S., ABOUELKARAM, S., LEPETIT, J. Beef meat electrical impedance spectroscopy and anisotropy sensing for non-invasive early assessment of meat ageing. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p.116–122, 2008.
- DEBARRET-LADRAT, C., CRERET, R., TAYLOR, R., VERREZ-BAGNIS, V. Trends in “*post mortem*” aging in fish: Understanding proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. Critical Review. **Food Science Nutrition**, v.46, p.490-21, 2006.
- DONG, W.K. Somatosensory, multisensory, and task-related neurons in cortical area 7b (PF) of un anesthetized monkeys. **Journal of Neurophysiology**, v. 72, n. 2, p. 542–564, 1994.
- DUNAJSKI, E. Texture of fish muscle. **Journal of Texture Studies**, v.10, p.301–318, 1979.

- EFSA - European Food Safety Authority. Welfare aspects of animal stunning and killing methods. **The European Food and Safety Authority Journal** p.241, 2004.
- EFSA - European Food Safety Authority. Species-specific welfare aspects of the main systems of the stunning and killing of farmed Atlantic salmon. Scientific opinion of panel on animal health and welfare. **The European Food and Safety Authority Journal** p. 1–77, 2009.
- EINEN, O., GUERIN, T., FJAERA, S.O., SKJERVOLD, P.O. Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 212, p.129–140, 2002.
- ERIKSON, U., SIGHOLT, T., SELAND, A. Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture** v.149, p.243–252 1997.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, p.243, 2012-2014. Disponível em: <http://www.fao.org> Acesso em 14 de julho de 2014.
- FERREIRA, S.R.S. **Contribuição da tecnologia de irradiação de alimentos no fornecimento de segurança alimentar e nutricional**. 1999. 172p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.
- FLETCHER, G.C., HALLETT, I.C., JERRETT, A.R., HOLLAND, A.J. Changes in the fine structure of the myocommata muscle fibre junction related to gaping in rested and exercised muscle from king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **LTW-Food Science and Technology**, v.30, p.246–252, 1997.
- HAARD, N. The role of enzymes in determining seafood color, flavor and texture. In: **Safety and quality issues in fish processing**. Cambridge, 2002, 520p.
- HÅSTEIN, T., SCARFE, A.D., LUND, V.L. Science based assessment of welfare: aquatic animals. In Animal welfare: global issues, trends and challenges. **Review Scientific and Technical of the Office Epizootics**, v. 24, n.2, p 529–547, 2005.
- HAUCK, F.R. Some harmful effects of the electro shocker on large rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 77, p.61–64, 1949.
- HAUPT, P., JANIG, W., KOHLER, W. Response pattern of visceral afferent fibers, supplying the colon, upon chemical and mechanical stimuli. **European Journal of Physiology**, v.398, p.41–7, 1983.
- HUNTINGFORD, F.A., KADRI, S. Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. **Review Scientific and Technical of the Office Epizootics**. v.33, n.1, p. 233-244, 2014.

- HYLDIG, et al. Fish and sensory analysis in the fish chain. In: T, BOYLSTON et al. **Handbook of meat, poultry e seafood quality**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007, 499-510p.
- JERRETT, A.R., STEVENS, J., HOLLAND, A.J. Tensile properties of white muscle in rested and exhausted Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal Food and Science**, v.61, p.527–532, 1996.
- JERRETT, A.R., HOLLAND, A.J. Rigor tension development in excised “rested”, “partially exercised” and “exhausted” Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) white muscle. **Journal Food and Science**, v.63, p.48–52, 1998.
- KESTIN, S.C., VAN DE VIS, J.W., ROBB, D.F.H. A simple protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of stunning and killing methods used on fish. **Veterinary Record** 150, 302–307, 2001.
- KIESSLING, A., ESPE, M., RUOHONEN, K., MØRKØRE, T. Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO₂ anaesthesia. **Aquaculture**, v.236(1-4), p.645–657, 2004.
- KOOI, K.A., TUCKER, R.P., MARSHAL, R.R., **Fundamentals of Electroencephalography**. New York: 2^a ed. Harper and Row, 1978.
- KUMAZAWA, T., MIZUMURA, K. Thin fiber receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in skeletal muscle of dog. **Journal of Physiology**, v. 273, p. 179–94, 1977.
- LAMARQUE, P. Electrophysiology of fish in electric fields. In: COWX, I.G., LAMARQUE, P. **Fishing With Electricity. Applications in Freshwater Fisheries Management**. Oxford: Fishing News Books Ltd, 1990, 4–33p.
- LAMBOOIJ, E., VAN DE VIS, J.W., KLOOSTERBOER, R.J., PIETERSE, C. Evaluation of captive needle stunning of farmed eel (*Anguilla anguilla* L.): suitability for humane slaughter. **Aquaculture**, v.212, p.141–148, 2002a.
- LAMBOOIJ, E., VAN DE VIS, J.W., KLOOSTERBOER, R.J., PIETERSE, C. Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla anguilla* L.): neurological and behavioural assessment. **Aquaculture**, v.210, p.159–169, 2002b.
- LAMBOOIJ, B., KLOOSTERBOER, K., GERRITZEN, M.A., ANDRE, G., VELDMAN, M., VAN DE VIS, H. Electrical stunning followed by decapitation or chilling of African catfish (*Clarias gariepinus*): assessment of behavioural and neural parameters and product quality. **Aquaculture Research**, v.37, p.61–70, 2006a.
- LAMBOOIJ, E., PILARCZYK, M., BIALOWAS, H., VAN DEN BOOGAART, J. G. M., VAN DE VIS, J. W. Electrical and percussive stunning of the common carp (*Cyprinus carpio* L.): Neurological and behavioural assessment. **Aquacultural**

- Engineering**, v.37, n.2, p.171–179, 2007.
- LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. Porto Alegre: 6ª ed. Artmed, 2005, 384 p.
- LEET, N. G., DEVINE, C. E., GAVEY, A. B. The histology of blood splash in lamb. **Meat Science**, v.1, p.229-234, 1977.
- LEFÈVRE, F., BUGEON, J., AUPÉRIN, B., AUBIN, J. Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. **Aquaculture**, v.284, n. 81, p.1- 4, 2008.
- LEPETIT, J., ALE, P., FAVIER, R., DALLE, R. Electrical impedance and tenderisation in bovine meat. **Meat Science**, v.60, p. 51–62, 2002.
- LINES, J.A., ROBB, D. H., KESTIN, A. S. C., CROOK, S. C., BENSON, T. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. **Aquacultural Engineering**, v.28, p.141-154, 2003.
- LINES, J., KESTIN, S. Electrical stunning of fish: the relationship between the electric field strength and water conductivity. **Aquaculture**, v.241, p. 219–234, 2004.
- LINES, J. A., KESTIN, A. S. Electric stunning of trout: power reduction using a two-stage stun. **Aquacultural Engineering**, v.32, p.483–491, 2005.
- LOPES DA SILVA, H.F. The assessment of consciousness: general principles and practical aspects. In: EIKELENBOOM, G. **Stunning of Animals for Slaughter**. The Hague: Martinus Nijhoff, 1983, 3–12p.
- LOVE, R.M. **The Food Fishes: Their Intrinsic Variation and Practical Implications**. London: Farrand Press, 1988, 276p.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatística da Pesca e Aquicultura, 2012 - 2014**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/>> Acesso em 15 de agosto, 2014.
- MARTINS, C. I. M., GALHARDO, L., NOBLE, C., DAMSGARD, B., SPEDICATO, M.T., ZUPA, W., BEAUCHAUD, M., KULCZYKOWSKA, E., MASSABUAU, J.C., CARTER, T., PLANELLAS, S.R. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. **Fish Physiology Biochemistry**, v.38, n.1, p. 17–41, 2012.
- MARX, H., BRUNNER, B., WEINZIERL, W., HOFFMANN, R., STOLLE, A. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. **Lebensmittel und Untersuchung Forschung**, v. 204, p. 282–286, 1997.
- MERKIN, G. V., ROTH, B., GJERSTAD, C., DAHL-PAULSEN, E., NORTVEDT, R. Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 309, p. 231–235, 2010.

- MOBERG, G.P. Influence of stress on reproduction: measure of well-being. In: MOBERG, G.P. **Animal Stress. American Physiological Society**, Bethesda, Maryland, 1985, 245–267p.
- MOBERG, G.P. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. **The biology of Animal Stress: Basic principles and implications for animal welfare**. California: CABI Publishing, 2000, 1- 22p.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S., SOBRAL, P.J. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo para elaboração de biofilmes **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.179-189, 2000.
- MORZEL, M., SOHIER, D., VAN DE VIS, H. Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v.83, p.19–28, 2003.
- NUNES, M.L. **Aplicação do Índice de Qualidade (QIM) na avaliação do frescor do pescado**. Lisboa: IPIMAR, 2007, 51p.
- OGAWA, M.; MAIA E.L. **Manual de Pesca: Ciência de Tecnologia do Pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 1999, 429p.
- OLIVO, R. SHIMOKOMAKI S. **Carnes: No caminho da pesquisa**. Cacoal do Sul: 2ª ed Imprint, 2002, 155p.
- ORDÓÑEZ PEREDA, J.A. **Tecnología de alimentos**. São Paulo: Artmed, v.2, 2005, 279p.
- OTTERA, H.; ROTH, B.; TORRISSEN, O.J. Do killing methods affect the quality of Atlantic Salmon? In: KESTIN, S.C.; WARRISS, P.D. **Farmed Fish Quality**. Oxford : Blackwell Science Ltd, 2001, 398–399p.
- PARISI, G., MECATTI, M., LUPI, P., SCAPPINI, F., POLI, B.M., Comparison of five slaughter methods for European sea bass. Changes of isometric contraction force and pH during the first 24 hours post mortem. **AQUACULTURE EUROPE 2002: SEA FARMING TODAY AND TOMORROW**, 2002. **Special Publication**, 2002, v.32, p. 417–418.
- PARK, J.W; LANIER, T.C. Scanning calorimetric behavior of tilapia myosin and actin due to processing of muscle and protein purification. **Journal of Food Science**, v.54, n1, p. 49-51, 1989.
- PEDRAZZANI, A.S., OSTRENSKY, A., CARNEIRO, P.C.F., GAYER, M.V., MOLENTO, C.F.M. Opinião pública e educação sobre abate humanitário de peixes no município de Araucária, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 976-983, 2008.

- POLI, B.M., PARISI, G., SCAPPINI, F., ZAMPACAVALLLO, G. Fish welfare and quality as affected by pre slaughter and slaughter management. **Aquaculture International**, v.13, p. 29–49, 2005.
- PRATES J.M.M. Maturação da carne dos mamíferos: Caracterização geral e modificações físicas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, n.533 p.34-41, 2000.
- PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. **Ciência de la carne y de los productos carnicos**. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 1994, 581p.
- RAWN, D. J. **Biochemistry**. North Carolina: Neil Patterson Publishers, 1989.
- ROBB, D.H.F., KESTIN, S.C., WARRISS, P.D. Muscle activity at slaughter: Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. **Aquaculture**, v.182, p. 261-269, 2000.
- ROBB, D.H.F. The relationship between killing methods and quality. In: KESTIN, S.C.; WARRISS, P.D. **Farmed fish quality**. Oxford:Blackwell Science, 2001, 220–330p.
- ROBB, D.F.H., KESTIN, S.C., Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. **Animal Welfare** v.11, p.269–282, 2002.
- ROBB, D. H. ROTH, B. Brain activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following electrical stunning using various field strengths and pulse durations. **Aquaculture**, v.216, p.363–369, 2003.
- ROBB, D.H.F. Welfare of Fish at Harvest. In: BRANSON E. J. **Fish Welfare**. Monmouthshire: Blackwell Publishing, 2008.
- ROTH, B., VELAND, J.O., MOELLER, D., IMSLAND, A., SLINDE, E. The effect of stunning methods on rigor mortis and texture properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Food Science**, v.67, p.1462-1466, 2002.
- ROTH, B., MOELLER, D., SLINDE, E. Ability of electric field strength, frequency, and current duration to stun farmed Atlantic salmon and Pollock and relations to observed injuries using sinusoidal and square wave alternating current. **North American Journal of Aquaculture**, v.66, p.208–216, 2004.
- ROTH, B., SLINDE, E., ARILDSEN, J. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. **Aquaculture**, v.257, p.504–510, 2006.
- ROTH, B., ØINES, S., ROTABAKK, B. T., BIRKELAND, S. Using electricity as a tool in quality studies of Atlantic salmon. **European Food Research and Technology**, v.227, n.2, p.571–577, 2007.
- RUBENSAM, J.M. transformações “*post mortem*” e qualidade da carne suína. IN: 1ª CONFERÊNCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE

- CARNE SUÍNA. 2000, Concórdia, **Anais...**Concórdia, p.89-99, 2000.
- SANT'ANA, L. S., FREITAS, M. Q. Aspectos sensoriais do pescado. In: GONÇALVES, A.A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo : Atheneu, 2011, 21-32p.
- SANT'ANA, L.S. Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.2253-2259, 2011.
- SANTOS, C. A. M. L. Qualidade do Pescado. In: GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011, 95-105p.
- SIKORSKI, Z.E., KOLAKOWSKA, A.J.R. **Post harvest biochemical and microbial changes, in Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation**. Zaragoza: CRC Press, Boca Raton, 1990, p 55–75.
- SIKORSKI, Z.E. **Composición nutritive de los principales grupos de organismos alimenticios marinos. Tecnologia de los produtos del mar**. Zaragoza: Acibria, 1990, p 41-72.
- SILVER, W.L., FINGER, T.E. The trigeminal system. In: SMELL, T.V.G. **Health and Disease**. New York : Raven Press, 1991, 97–107p.
- SKJERVOLD, P.O., FJAERA, S.O., SNIPEN, L. Predicting live-chilling dynamics of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.209, p.185–95, 2002.
- SNEDDON, L.U. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Applied Animal Behaviour Science**, v.83, p.153–62, 2003.
- SUSSEL, F. R. **Revista Anualpec**. Disponível em ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/Tilapia_2011.pdf Acesso em 15 de agosto de 2014.
- SWATLAND, H.J. Observations on rheological, electrical, and optical changes during rigor development in pork and beef. **Journal Animal Science**, v.75, p. 975–985, 1997.
- TAVARES, M., GONÇALVES, A. A. Aspectos físico-químicos do Pescado. In: GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011, 10-20p.
- THOMAS, P.M., PANKHURST, N.W., BREMNER, H.A. The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. **Journal Fish Biology**, v.54, p.1177–1196, 1999.
- TODA, K., ISHII, N. NAKAMURA, Y. Characteristics of mucosal nociceptors in the rat oral cavity: an in vitro study. **Neuroscience Letters**, v.228, p. 95–98, 1997

- TOLDRA, F. Muscle foods: water, structure and functionality. **Food Science and Technology International**, v.9, p.173–177, 2003.
- TORRY RESEARCH STATION. **Torry sensory assessment of fish quality**. Aberdeen: Torry Advisory, n° 91, 1989.
- TUCKEY, N. P. L., FORGAN, L. G., JERRETT, A. R. Fillet colour correlates with biochemical status in Australasian snapper (*Pagrus auratus*) during storage in refrigerated seawater. **Aquaculture**, v.356-357, p.256–263, 2012.
- URBINATI, E.C; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P. et al. **Tópicos especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo : TecArt, 2004, 171-194p.
- VAN DE VIS, J.W. et al. Effect of commercial and experimental slaughter of eels (*Anguilla anguilla* L) on quality and welfare. In: KESTIN, S.C.; WARRISS, P.D. **Farmed Fish Quality**. Oxford : Fishing News Books, 2001, 234–248p.
- VAN DE VIS, H., KESTIN, S., ROBB, D., OEHLenschLAGER, J., LAMBOOIJ, B., MUNKNER, W. NESVADBA, P. Is humane slaughter of fish possible for industry? **Aquaculture Research**, v.34(3), p. 211–220, 2003.
- VANNUCCINI, S. El enfoque del nuevo mercado de tilapia e nel mundo Occidental. **Panorama Acuicola**, v.4, n.3, p.22-25, 1999.
- VIEIRA, R. H. S. F. Microbiologia do Pescado In: GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011, 33-42p.
- VOLPATO, G.L., GONÇALVES, F., CASTILHO, M.F. Insight into the concept of fish welfare. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.75, p.165-171, 2007.
- WILLIAMS, J.C., VIMINI, R.J., FIELD, R.A., RILEY, M.L., KUNSMAN, J.E. Influence of Delayed Bleeding on Sensory Characteristics of Beef. **Meat Science** v. 9, p.181-190, 1983.
- YUE, S., MOCCIA, R.D., DUNCAN, I.J.H. Investigating fear in domestic rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), using an avoidance learning task. **Applied Animal Behaviour Science**, v.87, p.343–54, 2004.

6. CAPITULO I

INSENSIBILIZAÇÃO ELÉTRICA EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*): AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS, RESPOSTA AOS ESTÍMULOS E REFLEXOS CLÍNICOS.

6.1. RESUMO:

Diversos métodos utilizados para insensibilizar os peixes, expõem os animais a dores e sofrimentos desnecessários. Estudos vêm propondo métodos de insensibilização que garantem o bem-estar e práticas humanitárias de abate aos peixes. A eletronarcose é uma técnica rápida e causa aparentemente menos sofrimento, entretanto há necessidade de ajustar as condições do campo elétrico para assegurar que não ocorram danos à carcaça. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes voltagens (100 e 200 volts) e tempos de exposição (20, 40 e 60 s) ao choque elétrico, como método de insensibilização em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*); e pretendeu-se avaliar o bem-estar em tilápias do Nilo por meio de parâmetros comportamentais, resposta aos estímulos ou reflexos clínicos, avaliação sensorial e cor instrumental. Os testes comportamentais foram capazes de indicar o estado de inconsciência da tilápia e mostraram que as melhores combinações de corrente elétrica e tempo de exposição para insensibilizar o maior número de peixes foi de 100 e 200 volts durante 60s. O teste de ordenação mostrou que a intensidade hemorrágica nos filés, coloração avermelhada, foi mais intensa para os filés do tratamento de 200V/60s e menos intensa para os filés do tratamento 100V/40s. A ausência da rotação dos olhos e da respiração rítmica mostraram que os peixes dos tratamentos 100V/60s, 200V/40s e 200V/60s apresentaram escores próximos a zero entre 0 e 1 min, portanto estavam seguramente insensibilizados. O tempo considerado mais seguro para realizar o abate, onde a maioria dos parâmetros avaliados (natação, equilíbrio, manipulação, picada, rotação dos olhos e movimento opercular) estavam ausentes, foi de até 1 min após a insensibilização. O tratamento que

garantiu condições de bem-estar aos peixes e proporcionou aos filés menores intensidades da coloração vermelha foi 100V/60s.

Palavras-chave: tilápia do Nilo, abate humanitário, eletronarcose

6.2. ABSTRACT:

Several methods used for stunning/killing, expose animals to unnecessary pain and suffering. Studies have been proposing stunning methods that ensure the welfare and humanitarian slaughter practices to fish. The electronarcosis technique is rapid and apparently causes less suffering, however there is a need to adjust the electric field conditions to avoid damages to the carcass. The aim of this study was to evaluate different voltages (100 and 200 volts) and exposure times (20, 40 and 60 s) to electric shock as a method of stunning/killing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); and to assess the welfare in Nile tilapia through behavioral parameters, response to stimuli or clinical reflexes, sensory evaluation and instrumental color. Behavioral tests indicated the state of unconsciousness of tilapia, and showed that the best combination of voltage and exposure time was 100 and 200 volts for 60 seconds to stun the largest amount of fish. Ordering test showed that the hemorrhagic intensity in the fillets, red color, was more intense for the fillets of the treatment 200V / 60s and less intense for the fillets of 100V / 40s treatment. The absence of rotation of the eyes and rhythmic breathing showed that fish of treatments 100V/60s, 200V/40s and 200V / 60s with scores near zero between 0 and 1 min, therefore were safely stunned. The time considered safer to carry out the slaughter, where most of the evaluated parameters (swimming, balance, handling, sting, rotation of the eyes and opercular movement) were absent was up to 1 min after stunning. The treatment 100V / 60s ensured welfare conditions for fish and provided fillets with lower intensities of red.

Keywords: Nile tilapia, humanitarian slaughter, electronarcosis

6.3. INTRODUÇÃO

Métodos de insensibilização adequados, aliados ao bom manejo pré-abate, são considerados práticas “humanitárias” dentro do conceito de bem-estar animal (LAMBOOIJ et al., 2002). Utilizando a combinação de alguns indicadores, para avaliar o bem-estar animal, algumas medidas simples podem ajudar na solução deste problema complexo, como o fornecimento adequado de ração ao animal, de modo que ele não sinta fome ou sede, o local onde será alojado deve ser cômodo para facilitar o movimento e apresentar conforto térmico. Os animais devem estar saudáveis, livre de doenças, lesões, ou qualquer tipo de dor causada por práticas inadequadas de manejo (VILANOVA, 2008).

O bem-estar em peixes não deve ser avaliado somente no momento do abate, mas nas diversas situações que antecedem essa etapa, como no momento da captura, durante o transporte, na recepção no local de abate, e na densidade de estocagem (EFSA, 2004). É importante executar essas práticas de forma cautelosa e rápida, para assegurar o bem-estar até o momento do abate e garantir boa qualidade da carne.

Muitos métodos utilizados pelas indústrias para insensibilizar e abater os peixes são em sua maioria, considerados estressantes, como divulgou a FAWC (1996) em seu relatório sobre bem-estar. Desta forma, há incentivo à comunidade científica mundial para realizar diversas pesquisas sobre os métodos de abate mais humanitários. Para um método de abate ser considerado humanitário, deve insensibilizar instantaneamente os animais, havendo perda imediata e completa da atividade cerebral para que eles permaneçam insensíveis à dor ou sofrimento (EEC, 1993). Segundo Kestin et al. (2002) a rapidez com que o método escolhido insensibilize o peixe é que vai demonstrar se ele é ou não considerado um método humanitário.

Dentre os vários métodos de insensibilização existentes, à eletronarcose é uma das técnicas mais estudadas, nas diversas espécies de peixes (NORDGREEN et al., 2008) e pode ser considerada humanitária por ser rápida e causar aparentemente menos sofrimento em relação às demais técnicas. A vantagem do método é a manipulação de grandes lotes de peixes, e pode ser realizada dentro da água, com a aplicação de uma corrente elétrica, ou pode ser aplicada de forma individual, diretamente na cabeça do peixe (EFSA, 2009). A técnica afeta

diretamente o sistema nervoso central (SNS) produzindo espasmos musculares rapidamente alternados que provocam o bloqueio dos impulsos nervosos (KOOI, 1978).

A eletronarcose é uma técnica que ainda necessita de maiores estudos para ser bem executada, porque ainda não existem padrões pré-determinados para as variáveis de voltagem, intensidade da corrente e do tempo de exposição para cada espécie de peixe (NORDGREEN et al., 2008; ROBB; ROTH, 2003). De acordo com Lines et al. (2003), o estudo destas variáveis é importante na prevenção de alguns efeitos indesejáveis, como a ruptura de ossos e hemorragias no músculo, no momento da insensibilização.

Alguns estudos demonstram a eficiência da eletronarcose em relação aos demais métodos de abate. Lambooij et al. (2006), atordoando o bagre africano (*Clarias gariepinus*) com água e gelo à temperatura de 0,1°C durante 30 min observaram um comportamento de natação rápida e tentativa de fuga, seguido de câimbras musculares e taquicardia, concluindo que o peixe estava consciente e estressado. Quando os animais foram expostos ao choque elétrico, ocorreu a perda imediata de consciência, com a aplicação de uma corrente de 300V durante 1s, portanto a eletronarcose é um método que insensibiliza esta espécie de forma instantânea. Em carpa comum (*Cyprinus carpio L.*), a aplicação de 411V por 5s, combinados com resfriamento em água e gelo, demonstraram que o procedimento é eficaz para o abate em carpas, quando comparados com a percussão craniana, realizada com uma pistola, na qual foram observadas ondas cerebrais em alguns animais após o atordoamento (LAMBOOIJ et al., 2007).

O atordoamento elétrico realizado em claresse (*Heteroclarias sp.*) e bagre africano (*Clarias gariepinus*), utilizando 150V durante 5s, seguido de refrigeração e decapitação demonstrou que esses peixes permaneceram inconscientes por até 124s após o atordoamento (SATTARI et al., 2010). Roth et al. (2006), verificaram que a aplicação de 5V em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) é suficiente para estimular o sistema nervoso central. Para garantir maior eficiência do método de insensibilização, Roth et al. (2012) propõem que é necessário utilizar, para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) 60V por 6s.

Métodos de insensibilização testados em trutas, aplicando a eletronarcose com uma tensão de 166V e 250V a 1000Hz durante 60s, demonstraram que 166V, foi menos eficiente para prolongar o estado de inconsciência dos peixes sendo observado que 50% dos animais recuperaram muito rapidamente a respiração, enquanto a 250V nenhum dos animais recuperou a respiração. Portanto a maior voltagem garantiu às trutas um abate humanitário, e proporcionou elevados padrões de qualidade da carcaça (LINES et al., 2003).

A aplicação de alguns métodos de atordoamento vem sendo utilizado com o uso de eletroencefalograma (EEG) como ferramenta para avaliação e validação das respostas da função cerebral, uma vez que essa técnica já é bastante empregada para mamíferos e aves (GREGORY, 2005). No entanto, essa técnica é bastante complexa e demorada para ser executada, e mostra-se pouco adequada para ser aplicada no campo, como em indústrias, pisciculturas, ou mesmo em barcos de captura (ROBB et al., 2000).

As observações comportamentais têm sido amplamente utilizadas para avaliar a indução dos métodos ao abate em mamíferos e aves (GREGORY, 1987). O nível de consciência e da função cerebral foram deduzidos a partir de uma série de observações estruturadas em comportamentos auto iniciados. Alguns sinais são frequentemente observados em peixes como indicadores de mudanças do comportamento, os quais fornecem uma estimativa do estresse sofrido pelo animal durante a insensibilização. São avaliados por meio da capacidade de natação espontânea, movimento das brânquias, capacidade de manter o seu equilíbrio, movimento dos olhos seguido por rotação no eixo longitudinal, reação à punção com agulha ao longo da linha lateral (MARX et al., 1997; TOBIASSEN; SØRENSEN, 1999).

Segundo Anil (1991) reflexos mediados pelo tronco encefálico como a respiração rítmica ou o reflexo da córnea, são largamente utilizados na avaliação de respostas de mamíferos e aves em procedimentos de abate. Esses reflexos são os últimos sinais a serem perdidos durante práticas de insensibilização e os primeiros a serem recuperados após a insensibilização (GREGORY; WOTTON, 1983). Quando ocorre a ausência total desses dois reflexos, conclui-se que o animal está seguramente insensibilizado (ANIL, 1991). Portanto, alguns métodos

robustos e simples podem ser utilizados para avaliar o nível da função cerebral em peixes por meio de uma série de observações comportamentais, propostas por Kestin et al. (2002).

O objetivo deste estudo foi testar diferentes voltagens e tempos de exposição à eletronarcose, como método de insensibilização em tilápia do Nilo e avaliar as variáveis comportamentais, resposta aos estímulos ou reflexos clínicos, para selecionar os melhores parâmetros elétricos que garantiram as melhores condições de bem-estar durante o abate.

6.4. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se 63 exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de $629,2 \pm 115,93$ g e comprimento $29,72 \pm 1,52$ cm, adquiridos em uma piscicultura comercial. Os peixes foram transportados vivos até o Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP), onde foram alojados em dois tanques de alvenaria com capacidade de 5000L de água e renovação constante, por 48h antes dos testes.

Os parâmetros de qualidade da água foram verificados com o auxílio da sonda multi-parâmetro (Horiba), os quais mantiveram-se constantes ao longo dos ensaios, pH 5,79, oxigênio dissolvido 4,76mg/L e temperatura da água 27,5°C. A insensibilização foi realizada em uma caixa plástica de 120L, com água salinizada a 0,03% e condutividade elétrica pré-ajustada em 700 μ S, e corrente alternada (AC), com frequência de 60Hz. Para gerar o campo elétrico na caixa com água utilizou-se duas placas de alumínio (65 x 35 cm de largura) colocadas em duas paredes da caixa, a uma distância de 49 cm, e em cada placa foi acoplado um eletrodo, que estava conectado ao equipamento. Foram testados 6 tratamentos de insensibilização utilizando a eletronarcose, (100 e 200 volts) e tempos de exposição (20, 40 e 60 s) e o controle com a utilização de benzocaína, na proporção de 1g para 10L de água, dissolvida em álcool 70% e misturada numa caixa com capacidade de 120L de água. Para cada tratamento utilizou-se 9 peixes, distribuídos em lotes de 3 peixes cada.

Após a insensibilização cada peixe foi transferido para uma caixa plástica, contendo 120L de água, onde avaliaram-se os parâmetros comportamentais: natação e equilíbrio; resposta aos estímulos: manipulação e picada e reflexos clínicos: movimento opercular e rotação dos olhos. A cada atributo foi dado um escore de 0 a 2, onde: 0 ausência total reflexos; 1 reflexos parciais e 2 reflexos normais, de acordo com a metodologia proposta por Kestin et al. (2002), (ANEXO I). Observações na mudança de cor do corpo e dos olhos, também foram registrados.

A avaliação foi realizada por 3 pessoas devidamente treinadas em intervalos de 1 minuto durante 10 min. Ao término de cada teste a maioria dos peixes já havia retomado parte dos seus reflexos e foram insensibilizados por solução de água e gelo, proporção (1:1) até a perda total dos reflexos e posteriormente realizou-se a sangria com corte dos arcos branquiais, como método de abate. Na sequência, os peixes foram pesados, medidos e filetados.

Os filés foram submetidos ao teste sensorial de ordenação (ABNT, 1994), no qual foi apresentado aos 9 julgadores, 6 bandejas com 6 amostras em cada uma, codificadas com 4 dígitos, solicitando a ordenação crescente de acordo com o atributo hemorragia no filé. A análise estatística do teste de ordenação foi realizada pelo teste de Friedman ($p < 0,05$). Os dados obtidos foram avaliados pela Tabela de Newell e Mac Farlane (1987), ao nível de 5 % de significância. As amostras que apresentaram uma diferença igual ou maior que 27, entre a somatória dos resultados, apresentam diferença ($p < 0,05$) entre si.

Os filés também foram submetidos à análise de cor instrumental usando um colorímetro portátil HunterLab (Miniscan XE), operando com iluminante D65, ângulo de 10° e célula de medida com abertura de 30 mm. Foram usados os parâmetros de cor de Luminosidade (L^*) varia de 0 a 100 (preto a branco); parâmetro (a^*) varia do verde (-) ao vermelho (+); parâmetro (b^*) varia do azul (-) ao amarelo (+) (CIE, 1978). Para cada filé foram realizadas 3 medidas na região acima da linha lateral, no sentido da cabeça para a cauda.

Para a análise comportamental, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial de 6 parâmetros (natação, manipulação, movimento opercular, rotação dos olhos, picada e equilíbrio do corpo) em 11

tempos observados (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), e 3 repetições por tratamento. Quando verificado efeito significativo nas médias de comportamento e cor instrumental, aplicou-se o teste de Tukey a nível de 5% de significância, com o programa SAS, versão 9.1 (2004).

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a aplicação da eletronarcose, os peixes apresentaram imobilidade instantânea ocorrida em função da perda imediata dos reflexos durante a geração do campo elétrico. Foi possível observar que a maioria dos peixes apresentou mudança em sua coloração. A tilápia do Nilo utilizada neste estudo apresenta coloração característica acinzentada com listras em tons mais escuros ao longo do corpo, mas no momento da aplicação do choque elétrico, sua cor tornou-se mais clara, aspecto esbranquiçado e as suas nadadeiras eriçadas.

Durante os testes comportamentais foi possível observar que os peixes também modificavam a coloração dos olhos, sendo possível quantificar essas mudanças por meio de estimativas de porcentagem. A coloração do corpo predominante na maioria dos peixes foi a clara, apresentada em 73% dos animais analisados. Foi avaliada a presença ou ausência de listras ao longo do corpo, e constatou-se que 53,19% dos peixes não apresentaram listras. A coloração dos olhos dominante foi a clara com 73,40% dos animais.

A sinalização visual é considerada o principal meio de comunicação em peixes, principalmente nos ciclídeos, que possuem a capacidade de mudar a coloração do seu corpo, de forma muito rápida. Isso ocorre em resposta à luz, temperatura ou a estímulos neuro-hormonais, entre outros, e este fenômeno é mediado pelo controle do sistema nervoso e hormonal que atua na expansão e contração das células cromatócitas que sintetizam e armazenam os pigmentos (NELISSEN, 1991; HULSCHER-EMEIS, 1992), e que foi alterado pela aplicação do campo elétrico.

De acordo com Barreto e Volpato (2006) o estresse social pode concomitantemente aumentar os níveis do hormônio alfa estimulador de melanócito, (α -MSH) que modula a dispersão das células cromatócitas, resultando

na alteração da coloração da pele dos peixes e pode ocorrer efeito semelhante sobre a cor dos olhos (HOGLUND et al., 2000).

Durante a avaliação comportamental, notou-se que alguns animais apresentaram espasmos musculares de forma esporádica ao longo do corpo e a maioria dos peixes já iniciava uma lenta recuperação dos movimentos operculares. Na Tabela 6.1 é apresentada a avaliação dos parâmetros comportamentais, na qual podemos observar que o maior número de animais totalmente ou parcialmente insensibilizados foi nos tempos entre (t0) e o (t1) min, ou seja, próximos do escore 0, tornando-se mais evidente nos tratamentos 100V/60s, 200V/40s e 200V/60s.

Van de Vis et al. (2001), utilizando corrente alternada em enguias (*A. anguilla*) observaram que os reflexos visuais mantiveram-se ausentes por um tempo médio de 85s. Lines et al. (2003), aplicando uma corrente elétrica em trutas (*O. mykiss*) demonstraram que a insensibilização pode ser alcançada em até 1s, e o prolongamento dessa exposição aumenta o estado de inconsciência.

Estudos avaliando diferentes intensidades de correntes demonstraram que a utilização de uma frequência de 400 Hz foi menos eficiente, em relação a 50 Hz para induzir a inconsciência prolongada em trutas (ROBB et al., 2002) e o tempo de recuperação em 50Hz foi significativamente maior do que a 400 Hz. Estes autores sugerem que o campo elétrico aplicado ao longo do corpo do peixe e não apenas na cabeça, foi mais eficaz para garantir uma rápida insensibilização, pois afeta as funções fisiológicas de vários órgãos, como o coração.

Robb e Roth (2003) observaram que para o salmão do Atlântico (*S. salar*) voltagem de 200V por 1s, resultou em recuperação dos reflexos visuais mais rápida do que quando testado 50V por 3s e 25V por 12s. Isso demonstra que a aplicação de maiores voltagens e menores tempos de exposição resultaram numa retomada mais rápida dos reflexos, do que quando aplicada menores voltagens e maiores tempos de exposição.

Foi possível observar na Figura 6.1, que os parâmetros de rotação dos olhos e movimento opercular dos peixes expostos a um campo elétrico por tempos mais prolongados, demonstraram maior eficácia em garantir a insensibilização de um número maior de peixes.

Tabela 6.1 Avaliação dos parâmetros de natação, equilíbrio, manipulação, picada, rotação dos olhos e movimento opercular em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Voltagem/tempo de exposição (Volt/s)	Escores de recuperação ao longo do tempo (min)										
	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9	t10
100/20	1,44 ^{bc}	3,11 ^b	4,77 ^{ab}	5,55 ^a	5,88 ^a	5,77 ^a	5,44 ^a	5,55 ^a	5,55 ^a	5,22 ^a	5,55 ^a
100/40	1,88 ^b	3,33 ^{ab}	4,22 ^{ab}	4,88 ^{ab}	5,11 ^a	5,11 ^a	5,11 ^a	5,22 ^a	5,77 ^a	5,77 ^a	5,44 ^a
100/60	0,55 ^{cd}	2,55 ^b	3,88 ^{ab}	5,33 ^a	5,66 ^a	5,11 ^a	5,77 ^a	5,77 ^a	5,33 ^a	5,55 ^a	5,33 ^a
200/20	1,22 ^{bc}	3,44 ^{ab}	5,22 ^a	5,33 ^a	5,55 ^a	5,22 ^a	5,44 ^a	5,22 ^a	5,22 ^a	5,22 ^a	5,66 ^a
200/40	0,44 ^{cd}	3,22 ^{ab}	4,77 ^{ab}	5,11 ^a	5,22 ^a	5,44 ^a	5,44 ^a	5,66 ^a	5,55 ^a	5,33 ^a	5,44 ^a
200/60	0 ^d	2,33 ^b	3,44 ^{ab}	3,5 ^b	5,22 ^a	5,66 ^a	5,77 ^a	5,77 ^a	5,88 ^a	5,66 ^a	5,77 ^a
Anestésico	6,00 ^a	5,00 ^a	3,13 ^b	1,75 ^c	0,87 ^b	0,25 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b

Médias com a mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância de acordo com o teste de Tukey. O erro padrão para os dados apresentados foi de 0,31.

Entre os tratamentos testados foi possível verificar por meio da rotação dos olhos e da respiração (observada pelo batimento opercular) que os tratamentos que apresentaram escores próximos a zero nos tempos entre 0 e 1 min foram 100V/60s, 200V/40s e 200V/60s, como mostra a Figura 6.1). Se a rotação dos olhos e a respiração estiverem ausentes, é seguro afirmar que o peixe está insensibilizado (KESTIN et al., 2002).

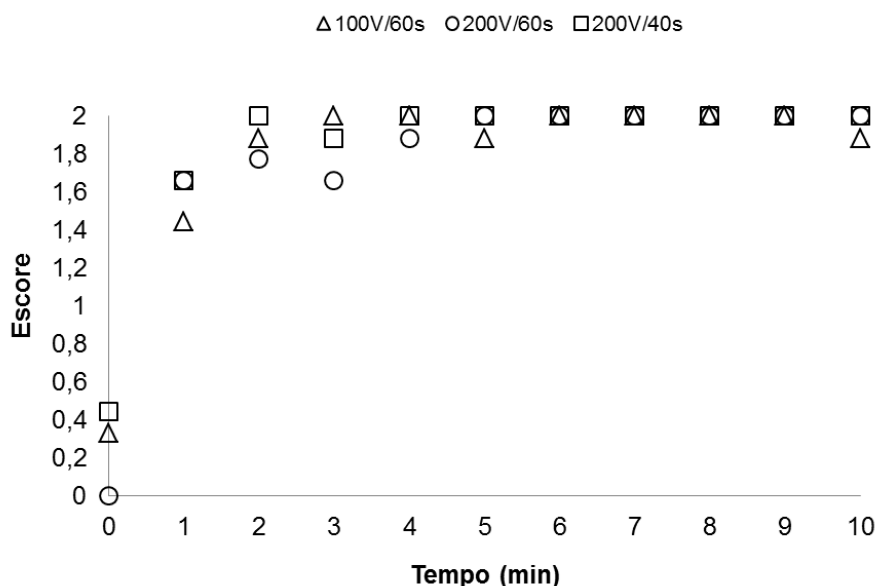


Figura 6.1 Recuperação do movimento opercular e rotação dos olhos em tilápia do Nilo, utilizando diferentes voltagens.

Na maioria dos tratamentos foi possível observar que quando se reiniciou a respiração rítmica de forma lenta, paralelamente, ocorreu o reflexo da córnea em um ou nos dois olhos do peixe, portanto, o retorno desses dois reflexos foi verificado de forma simultânea. Na sequência foi observado o retorno do reflexo de picada, onde na medida em que a agulha era passada ao longo da linha lateral do corpo, observava-se que os peixes eriçavam as nadadeiras, e quando eram postos na água de cabeça para baixo já havia um pequeno reflexo para retomar o seu equilíbrio.

Kestin et al. (1995), após avaliarem atordoamento elétrico em truta arco-íris (*O. mykiss*) relataram que os peixes encontravam-se numa fase tônica com padrão cerebral epileptiforme, demonstrando ausência dos movimentos operculares, portanto estavam seguramente inconscientes e insensibilizados. De acordo com KESTIN et al. (2002) utilizando esses parâmetros comportamentais é possível

avaliar um grande número de peixes e verificar a eficiência do método de insensibilização.

O teste de ordenação realizado para avaliar a intensidade hemorrágica nos filés de tilápia (Tabela 6.2) demonstrou que houve diferenças significativas entre os tratamentos 100V/40s e 200V/60s, sendo que a maioria dos avaliadores classificou a maior voltagem como sendo a responsável por causar um aumento de hemorragias nos filés, sendo notada pela presença da coloração avermelhada. A menor voltagem foi classificada como sendo a menos hemorrágica, apresentando filés com coloração mais clara (Tabela 6.2). Todos os peixes submetidos ao tratamento anestésico e a menor voltagem de 100V, independentes dos tempos de exposição ao campo elétrico apresentaram coloração mais clara em seus filés. De forma geral, os peixes submetidos a maior voltagem apresentaram filés mais escuros.

Tabela 6.2 Médias do teste de ordenação de cor nos filés de tilápia do Nilo

Tratamentos	Somatório
100V/20s	36 ^{ab}
100V/40s	25 ^b
100V/60s	31 ^{ab}
200V/20s	37 ^{ab}
200V/40s	32 ^{ab}
200V/60s	52 ^a

* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$) segundo o método de Friedman

De acordo com Roth et al. (2004) e Lines e Kestin (2005) a força de contração muscular sofrida pelos peixes durante a eletronarcose, pode causar danos na coluna vertebral, lesionando a aorta dorsal bem como as veias e causar hematomas no filé. O risco de ocorrer essas lesões depende do tipo de corrente, frequência e da intensidade do campo elétrico utilizado.



Figura 6.2 Filés de tilápia do Nilo utilizados para análise sensorial e cor instrumental.

A cor instrumental não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Os valores médios para (L^*) luminosidade, (a^*) intensidade de vermelho e (b^*) intensidade do amarelo, foram $30,83 \pm 2,03$, $-2,13 \pm 0,79$ e $-0,50 \pm 0,96$, respectivamente. SCHERER et al. (2006) também não observaram variações nos parâmetros de cor instrumental na carne da carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetida à eletronarcose e ao choque térmico.

6.6. CONCLUSÕES

Os testes comportamentais foram capazes de discriminar o estado de consciência da tilápia do Nilo. As combinações de voltagens e tempos de exposição mais eficientes para insensibilizar a maioria dos peixes foram 100 e 200 Volts durante o tempo de 60 segundos.

Por meio da avaliação sensorial foi possível observar que nos filés dos peixes atordoados com a maior voltagem ocorreu maior intensidade da coloração vermelha, portanto recomenda-se utilizar o tratamento de 100V/60s para insensibilizar as tilápias do Nilo.

O tempo considerado mais seguro para realizar o abate, com base na perda de todos os parâmetros comportamentais foi de até 1 minuto após a insensibilização.

6.7. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa (CNPq nº475374/2012-6).

À CAPES pela bolsa concedida a aluna de doutorado.

6.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIL, M. H. Studies on the return of physical reflexes in pigs following electrical stunning. **Meat Science**, v. 30, p.13-21, 1991.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - **ABNT- NBR 13170**: Teste de ordenação em análise sensorial, Rio de Janeiro, 1994.

BARRETO, R. E., VOLPATO, G. L. Stress responses of the fish Nile tilapia subjected to electroshock and social stressors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.39, p.1605–1612, 2006.

CIE - Commission Internationale de l'éclairage. **Recommendations on uniform colourspaces–colour equations, psychometric colour terms**. Paris: n.2 to CIE Publ. n.15 (E-1.3.L) 1971/9TC-1- 3, 1978.

EEC. Council Directive 93/119/EC of 22 December 1993 on the protection of animals at the time of slaughter or killing. **Official Journal of the European Communities**. v. 340, p. 21–34, 1993.

EFSA - European Food Safety Authority. **Welfare Aspects Of Animal Stunning And Killing Methods**, 2004, 20-71p.

EFSA - European Food Safety Authority. **Species-specific welfare aspects of the main systems of the stunning and killing of farmed Atlantic salmon**. Scientific opinion of panel on animal health and welfare, 2009, p.1–77.

FAWC. Report on the welfare of farmed fish. **Farm Animal Welfare Council**. London, 1996.

GREGORY, N. G., WOTTON, S.B. Studies in the central nervous system: visually evoked cortical responses in sheep. **Research in Veterinary Science** v.34, p.315-319, 1983.

GREGORY, N. G. Determinations of impaired brain function in animals in the laboratory. In: CARTER, H. E. V. **Pre-slaughter Stunning of Food Animals**, 1987.

- GREGORY, N. G. Recent concerns about stunning and slaughter. Review. **Meat Science** v.70 p.481–491, 2005.
- HOGLUND, E., BALM, P.H.M., WINBERG, S. Skin darkening, a potential social signal in subordinate Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): the regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. **Journal of Experimental Biology**, v.203, p.1711–1721, 2000.
- HULSCHER-EMEIS, T. M. The variable colour patterns of tilapia zillii (*Cichlidae*): integrating ethology, chromatophore regulation and the physiology of stress. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 42, p.525–560, 1992.
- KESTIN, S., WOTTON, S., ADAMS, S. The effect of CO₂ concussion or electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on fish welfare. In: SVENNEVIG, N.; GENT, A.; KROGDAL, L. **Quality in aquaculture**. Belgium: EAS Special Publication, 1995, v.23, 380p.
- KESTIN, S. C., VAN DE VIS, J. W., ROBB, D. H. F. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. **Veterinary Record**, v.150, p.302–307, 2002.
- KOOI, K.A., TUCKER, R.P., MARSHAL, R.R. **Fundamentals of Electro Encephalography**. New York: 2nded Harper and Row, 1978, 125–145p.
- LAMBOOIJ, E., VAN DE VIS, J.W., KLOOSTERBOER, R.J., PIETERSE, C., Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla Anguilla* L.): neurological and behavioral assessment. **Aquaculture**, v. 210, p.159–169, 2002.
- LAMBOOIJ, E., KLOOSTERBOER, R. J., GERRITZEN, M. A., E VAN DE VIS, J. W. Assessment of electrical stunning in fresh water of African Catfish (*Clarias gariepinus*) and chilling in ice water for loss of consciousness and sensibility. **Aquaculture**, v.254, p.388–395, 2006.
- LAMBOOIJ, E., PILARCZYK, M., BIALOWAS, H., VAN DEN BOOGAART, J. G. M., VAN DE VIS, J. W. Electrical and percussive stunning of the common carp (*Cyprinus carpio* L.): Neurological and behavioral assessment. **Aquacultural Engineering**, v.37(2), p.171–179, 2007.
- LINES, J. A., ROBB, D. H., KESTIN, S. C., CROOK, S. C., BENSON, T. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. **Aquacultural Engineering**, v.28(3–4), p.141–154, 2003.
- LINES, J., KESTIN, S. Electric stunning of trout: power reduction using a two stage stun. **Aquacultural Engineering**, v.32, p.483–491, 2005.
- MARX, H., BRUNNER, B., WEINZIERL, W., HOFFMAN, R. STOLLE, A. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of

- animal welfare. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung** v.204, p.282–286, 1997.
- NELISSEN, M. H. J. Communication. In: KEENLEYSIDE, M. H. A. **Cichlid Fishes: Behaviour, Ecology and Evolution**. London: Chapman & Hall, 1991, 225–241p.
- NEWELL, G. J., MAC FARLANE, J. D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 52, n.6, p. 1721-1725, 1987.
- NORDGREEN, A.H., SLINDE, E., MOLLER, D., ROTH, B. Effect of various electric field strengths and current durations on stunning and spinal injuries of Atlantic herring. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.20 p.110-115, 2008.
- ROBB, D. H. F., WOTTON, S. B., MCKINSTY, J. L., SORENSEN, N. K. KESTIN, S. C. Commercial slaughter methods used on Atlantic salmon: determination of the onset of brain failure by electroencephalography. **Veterinary Record** v.147, p. 298-303, 2000.
- ROBB, D. H., O' CALLAGHAN, M., LINES, J., KESTIN, S. Electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): factors that affect stun duration. **Aquaculture**, v.205(3-4), p.359–371, 2002.
- ROBB, D. H., ROTH, B. Brain activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following electrical stunning using various field strengths and pulse durations. **Aquaculture**, 216(1-4), 363–369, 2003.
- ROTH, B., MOELLER, D., SLINDE, E. Ability of electric field strength, frequency, and current duration to stun farmed Atlantic salmon and pollock and relations to observed injuries using sinusoidal and square wave alternating current. **North American Journal Aquaculture**, v.66, p.208–216, 2004.
- ROTH, B., SLINDE, E., ARILDSEN, J. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. **Aquaculture**, v.25, p.504–510, 2006.
- ROTH, B., GRIMSBØ, E., SLINDE, E., FOSS, A., STIEN, L. H., NORTVEDT, R. Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and rigor mortis. **Aquaculture**, v.326-329, p.178–180, 2012.
- SAS - Statistical analysis systems. User's guide. Version 9.1. Cary, 2004, 5136p.
- SATTARI, A., LAMBOOIJ, E., SHARIFI, H., ABBINK, W., REIMERT, H., VAN DE VIS, J. W. Industrial dry electro-stunning followed by chilling and decapitation as a slaughter method in Claresse® (*Heteroclinas sp.*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v. 302, p.100–105, 2010.

- SCHERER, R., AUGUSTI, P. R., BOCHI, V. C., STEFFENS, C., FRIES, L. L. M., DANIEL, A. P., EMANUELLI, T. Chemical and microbiological quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) slaughtered by different methods. **Food Chemistry**, v. 99, p.136–142, 2006.
- TOBIASSEN, T. AND SØRENSEN, N.K. Influence of killing methods on time of death of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as measured by behavioral indices of sensibility and reflexes. In: **Proceedings of the Aquaculture Europe**. EAS Special Publication, 1999 n.27, 244p.
- VAN DE VIS, J.W., OEHLenschläGER, J., KUHLMANN, H., MÜNKNER, W., ROBB, D.F.H., SCHELVIS-SMIT, A.A.M. Commercial and experimental slaughter of eel (*Anguilla anguilla*, L.): effect on quality and welfare. In: KESTIN, S.C., WARRISS, P.D. **Farmed Fish Quality**. Oxford : Blackwell, 2001, 234–257p.
- VILANOVA, M.X. Indicadores de bem-estar em animais de produção. I CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL E I SEMINÁRIO NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA E BIOTECNOLOGIA ANIMAL, 2008. **Anais**

6.9. ANEXO I

Parâmetros	Comportamentos avaliados	Escore
Natação (observar comportamento natação espontânea)	Natação normal	2
	Natação lenta/anormal	1
	Sem natação	0
Manipulação (tentativa de pegar pela cauda)	Vigorosa tentativa de escape	2
	Resposta lenta	1
	Sem resposta	0
Movimentos operculares (observar movimentos operculares na água ou no ar)	Movimento regular do opérculo	2
	Movimento lento e irregular	1
	Sem movimentos operculares	0
Rotação dos Olhos (movimento dos olhos quando o peixe é girado ao longo do eixo longitudinal)	Olhos rolam e tentativa de ficar na vertical	2
	Parcial VOR ou somente 1 olho mostrando VOR	1
	Olhos fixos	0
Picada (picada na linha lateral)	Movimentação	2
	Resposta lenta	1
	Sem resposta	0
Equilíbrio (inverter o peixe e observar resposta de correção na água)	Rápida retomada	2
	Vagarosa retomada	1
	Incapaz de retomar a posição	0

7. CAPITULO II

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA CARNE RESFRIADA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) SUBMETIDA A TRÊS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO

7.1. RESUMO:

O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes métodos de insensibilização, choque térmico, eletronarcose e anestésico em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estocadas refrigeradas a 4°C durante 25 dias sobre os parâmetros de qualidade de carne. Foram avaliados pH muscular e ocular, medidas dielétricas, contração muscular, rigor mortis, cor e textura instrumental, teor de Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV) e Nitrogênio Não Protéico (NNP), análises microbiológicas, ATP e seus catabólitos, e análise sensorial, realizados no tempos amostrais de zero (0); 0,11; 0,21; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias. Os peixes submetidos aos três métodos de insensibilização testados, apresentaram a entrada no estado de rigor mortis aos 7 dias de estocagem, concomitante com reduções dos valores de pH muscular, ocular e dos níveis de ATP no músculo. Os valores da medida dielétrica, textura instrumental, o conteúdo de BNV e NNP apresentaram comportamentos bastante similares entre os tratamentos, com reduções de seus valores ao longo do tempo de estocagem. O índice de frescor K e a análise sensorial dos peixes demonstraram que a tilápia refrigerada apresentou em até 7 dias de armazenamento, bom estado de frescor. A análise microbiológica confirmou que o abate e o processamento foram realizados de forma higiênica, evitando o crescimento de microrganismos indesejáveis. Conclui-se que a eletronarcose foi o método que garantiu de forma instantânea a insensibilização dos peixes, garantindo condições de bem-estar durante procedimentos de abate em tilápia do Nilo.

Palavras-chave: tilápia do Nilo, análise sensorial, qualidade da carne, frescor

7.2.ABSTRACT:

The objective of this study was to evaluate different methods of stunning/killing, thermal shock, electronarcosis and anesthetic, in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored refrigerated at 4 °C for 25 days on the quality parameters of the fillet. Were assessed by muscle and ocular pH measurements, dielectric measurements, muscle contraction, rigor mortis, color and instrumental texture, Volatile Nitrogen Bases (VNB) and Non-Protein Nitrogen (NPN), microbiological analysis, ATP and its catabolites, and sensory analysis; sampling was performed at time zero (0); 0.13; 0.21; 1; 7; 14; 18; 22 and 25 days. The three methods tested entered in the state of rigor mortis after 7 days of storage with concomitant reductions in muscle and ocular pH, and ATP levels. Results of the dielectric measurement, instrumental texture, content of VNB and NPN showed similar behavior between treatments, with reducing values over the storage time. The freshness index K and sensory analysis of fish showed that refrigerated tilapia presented within 7 days of storage, good state of freshness. Microbiological analysis confirmed that the slaughter and processing were performed hygienically, preventing the growth of undesirable microorganisms. It is concluded that electronarcosis was the method that ensured instantaneously stunning the fish, ensuring welfare conditions for stunning/killing procedures in Nile tilapia.

Keywords: Nile tilapia, sensory analysis, meat quality, freshness

7.3.INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor zootécnico que mais cresceu nos últimos anos e deve ser uma atividade direcionada a produção de alimentos seguros, e de forma sustentável. Com o contínuo crescimento da aquicultura industrial no mundo, aumentaram as discussões sobre o potencial negativo que esta atividade pode gerar, em termos de agressões ao meio ambiente, e as questões sobre as práticas adotadas para preservar o bem-estar dos peixes.

Muitos procedimentos aplicados na aquicultura propiciam condições estressantes aos peixes, como elevada densidade de estocagem, dietas não balanceadas, má qualidade da água, práticas de seleção, manejo, captura e transporte e procedimentos de abate (POLI et al., 2005). Práticas aplicadas no manejo pré-abate e no abate de peixes oriundos da aquicultura e seus efeitos sobre a qualidade da carne tornaram-se objeto de estudos crescente em todo o mundo.

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre a aplicação de diferentes métodos de abate e condições ótimas de conservação e processamento, para garantir boa qualidade da carne. Muitos métodos de insensibilização e abate utilizados nos peixes, não são considerados humanitários do ponto de vista do bem-estar animal. Esses métodos são caracterizados por causarem diversas reações de desconforto, além de provocar o sofrimento, em decorrência da perda da sensibilidade de forma lenta (ROBB, 2001; ROBB; KESTIN, 2002). Como consequência, causam reações de asfixia, espasmos musculares, morte por agonia prolongada, entre outros, o que pode causar danos prejudiciais e irreversíveis à qualidade da carne (POLI et al., 2005). Para garantir o bem-estar dos peixes no momento do abate, é essencial aplicar métodos de atordoamento apropriados (VAN DE VIS et al., 2003).

No Brasil, o procedimento comercial de abate mais utilizado em frigoríficos de peixes é a imersão dos animais em solução de água e gelo ou por asfixia em gelo, métodos que comprovadamente não causam a perda imediata da função cerebral (EFSA, 2009). Esse método atua na redução da temperatura corporal, reduzindo a atividade muscular e deixando os peixes paralisados pelo frio. Nesse

método de insensibilização os peixes morrem por anóxia, pela água gelada que colapsa as brânquias (SKJERVOLD et al., 2002). Um estudo realizado com bagre africano (*Clarias gariepinus*) demonstrou que a baixa atividade cerebral e perda de respostas a estímulos de dor foi observada após 15 min de exposição do peixe a solução de água e gelo (LAMBOOIJ et al., 2006).

Anestésicos são utilizados para executar muitos procedimentos de rotina em pisciculturas, porque atuam de forma rápida e causam o efeito de narcose, que provoca nos peixes um estado de inconsciência e imobilização, aliviando os animais de qualquer tipo de dor (Z AHL et al., 2012). Alguns pesquisadores utilizando o anestésico como método de insensibilização e abate para o linguado do senegal (*Solea senegalensis*), constataram que a sedação demonstrou ser uma boa forma de insensibilização para esta espécie (RIBAS et al., 2007).

Em estudos utilizando anestésicos eugenol e isoeugenol em peixes conclui-se que o anestésico é seguro e eficaz, e provoca a eutanásia em várias espécies de peixes (HOLLOWAY et al., 2004; IVERSEN et al., 2003). Efeitos sobre a eficácia do anestésico foram observados durante práticas de captura e manejo, e na sequência quando os peixes foram abatidos, observou-se que ocorreu atraso na entrada do estado de rigor mortis e a qualidade da carne foi mantida (JERRETT et al., 1996; MISIMI et al., 2008). Embora seja eficaz o uso de anestésico para insensibilizar os animais antes do abate, vários estudos de comportamento relatam que ele pode induzir o peixe a uma resposta de estresse (Z AHL et al., 2012). O uso de anestésico para insensibilizar ou abater peixes, causa resíduos químicos na carne do animal, portanto torna-se um método inviabilizado para o uso em peixes destinados ao consumo.

O atordoamento elétrico é um método de insensibilização que age de forma muito rápida, com a passagem da corrente elétrica através da cabeça do animal e estimula todas as regiões do cérebro, resultando em um insulto epileptiforme generalizado, onde o animal torna-se incapaz de responder aos estímulos nervosos (EFSA, 2009).

Embora o atordoamento elétrico seja recomendado e utilizado em peixes de vários países da Europa, alguns cuidados em relação aos ajustes dos parâmetros devem ser realizados durante a aplicação da eletricidade. Pode-se citar o tipo de corrente (AC - alternada, DC - contínua), a frequência da corrente e intensidade do campo elétrico e o tempo de exposição (ROTH et al., 2004; LINES

e KESTIN, 2005), para evitar possíveis hemorragias causadas no músculo pelo forte estímulo elétrico (HAUCK, 1949), podendo assim, comprometer a qualidade do produto final (ROBB; ROTH, 2003; LINES; KESTIN, 2004; POLI et al., 2005).

Lambooij et al. (2010) demonstraram que o atordoamento elétrico, quando executado em condições adequadas, insensibiliza o salmão em menos de 1s, e pode ser considerado um procedimento humanitário, para atordoar um grande número de peixes (LINES et al., 2003; ROBB et al., 2002).

Durante práticas de insensibilização e abate realizados em aves e mamíferos, quando foram adotados procedimentos para melhorar o bem-estar animal, verificou-se que a qualidade da carne foi otimizada (LAMBOOIJ et al., 2006). Em algumas espécies de peixes de cultivo, tais como a enguia (MORZEL e VAN DE VIS, 2003) e o pregado (MORZEL et al., 2003), quando foram aplicados procedimentos para reduzir o estresse no momento da abate, ocorreu influência positiva sobre a qualidade da carne.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes métodos de insensibilização (choque térmico, eletronarcose e o controle com anestésico) aplicados em tilápia do Nilo e resfriadas a 4°C e estocadas por 25 dias, através dos parâmetros indicadores de qualidade da carne, físicos, químicos, microbiológicos e sensoriais.

7.4. MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se 81 exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de 671,84±194g e comprimento 32,90±2,85cm, adquiridos em uma piscicultura comercial. Os peixes foram transportados vivos até o Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP). Foram alojados em dois tanques de alvenaria com capacidade de 5000L de água cada com renovação constante, e mantidos sob jejum por 48h antes dos testes.

7.4.1. Métodos de insensibilização

Três métodos de insensibilização foram testados, utilizando-se 27 peixes para cada tratamento:

- a) Eletronarcose: foi realizado dentro de uma caixa plástica com capacidade de 120L de água salinizada a 0,03% e condutividade elétrica pré-ajustada em 700 μ S. O campo elétrico foi gerado por duas placas de alumínio (65 x 35 cm de largura) colocadas em duas paredes da caixa, a uma distância de 49 cm, e em cada placa foi acoplado um eletrodo, que estava conectado ao equipamento. Foi aplicada uma tensão elétrica de 100 V durante 60s, corrente alternada (AC), frequência de 60Hz e amperagem de 4,0 A.
- b) Choque térmico: uma mistura de água e gelo na proporção de (1:1) totalizando o volume de 80L de solução, realizada numa caixa plástica com capacidade de 120L.
- c) Anestésico: a benzocaína foi dissolvida em álcool 70% e posteriormente foi misturada numa caixa com capacidade de 120L de água na proporção de 2g de benzocaína para 10L de água.

Após a exposição dos peixes aos diferentes métodos, foi constatada a insensibilização a partir do momento que ocorreu a ausência dos reflexos mediados pelo tronco encefálico, como a rotação dos olhos ao longo do eixo e o movimento opercular (ANIL,1991). Para complementar a avaliação comportamental, realizou-se a picada, com o auxílio de um alfinete ao longo da linha lateral do peixe, no sentido da cauda para a cabeça. Na sequência foi realizado o abate dos peixes pelo corte dos arcos branquiais, ocorrendo a sangria.

7.4.2. Procedimento Experimental

Após a morte, todos os peixes foram medidos com o auxílio de um ictiômetro, pesados em balança digital e identificados com etiquetas e submetidos à aferição do

Índice de Rigor Mortis inicial. Na sequência foram acondicionados em caixas isotérmicas com camadas alternadas de gelo e peixe que foram estocadas em câmara fria a 4,0°C durante 25 dias. A amostragem foi realizada em três peixes de cada tratamento, sendo retirados aleatoriamente em cada tempo amostral.

7.4.3. Métodos analíticos

7.4.3.1 índice de rigor mortis (IR)

O Índice de Rigor Mortis foi determinado em cada ponto amostral em (zero) 0, 0,13; 0,21; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias em três peixes de cada tratamento. Foi medido de acordo com Bito et al. (1983) e calculado de acordo com a equação:

$$IR(\%) = \frac{(D - D_0)}{D_0} * 100$$

Onde:

D_0 = Distância inicial da nadadeira caudal a partir de uma linha horizontal da mesa, medida imediatamente após a morte.

D = Distância inicial da nadadeira caudal a partir de uma linha horizontal da mesa, medida em determinado tempo após a determinação de D_0 .

7.4.3.2 pH muscular e ocular

A medida do pH foi realizada em (zero) 0; 0,13; 0,21; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias, diretamente no músculo ao lado esquerdo do peixe na região dorsal com a inserção do eletrodo em três pontos e o pH ocular foi medido diretamente no globo ocular esquerdo, utilizando um peagâmetro de punção portátil (Sentron 1001 Integrated Sensor Technology).

7.4.3.3 Medidas dielétricas

As medidas dielétricas foram realizadas em três peixes de cada tratamento do lado esquerdo em 0; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias, com o auxílio do equipamento

Fish Freshness Meter – Distrell's Torrymeter (Distell.com/FauldHouse – Scotland), o qual converte as medidas elétricas da integridade celular em uma escala de leitura.

7.4.3.4 Índice de Alteração dos Filés

A alteração foi medida em três filés direitos de cada tratamento retirados no momento do abate (0h). Esses filés foram colocados sob uma superfície plana protegidos com filme plástico, refrigerados em estufa (BOD TE 390, Tecnal), a 4°C. As medidas de comprimento e largura foram tomadas nos seguintes tempos 0; 0,13; 0,21; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias, com o auxílio de um paquímetro digital (Starret 799º series). O índice de contração do filé foi calculado de acordo com a equação:

$$\% \text{ Contração} = 100 - \left(C * \frac{100}{C_o} \right)$$

Onde:

C=comprimento final do filé

Co=comprimento inicial do filé

7.4.3.5. Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV) e Nitrogênio Não Protéico (NNP)

As Bases Nitrogenadas Voláteis foram determinadas de acordo com a metodologia de Howgate (1976) e o Nitrogênio Não Protéico de acordo com Horwitz (1980). Realizados em triplicata de três filés esquerdos de cada tratamento nos tempos de (zero) 0; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias. Os valores de BNV e NNP foram expressos em mgN/100g filé. Os resultados foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$BNV = \frac{\text{volume HCL} * \text{Normalidade HCL} * 14 * \text{volume extrato TCA} * 100}{25 * (\text{peso amostra})}$$

$$NNP = \frac{\text{volume HCL} * \text{Normalidade HCL} * 14 * \text{volume extrato TCA} * 100}{20 * (\text{peso amostra}) / \left[(\text{peso amostra}) * \frac{\text{umidade pescado}}{100} \right] + \text{volume extrato TCA}}$$

7.4.3.6 Coloração instrumental e textura

A cor instrumental foi avaliada em três filés direitos, nos quais foram determinados três pontos na porção dorsal do filé. Foram realizadas com um colorímetro HunterLab (Miniscan XE), operando com iluminante D65, ângulo de 10° e célula de medida com abertura de 30 mm. Foram usados os parâmetros de cor, luminosidade L^* varia de 0 a 100 (preto a branco); parâmetro a^* varia de verde (-) ao vermelho (+); e o parâmetro b^* do azul (-) ao amarelo (+) (CIE, 1978).

A textura instrumental foi realizada na porção dorsal de três filés direitos, de cada tratamento, com o auxílio de um texturômetro TA.XT icon (Stable Micro Systems, Surrey, U.K.), calibrado com peso padrão de 5kg, utilizando uma probe de alumínio (SMS P/20) com velocidade de 2,0 mm/s e altura plataforma 20mm. A variável calculada foi a força de compressão (N) utilizando 40% de compressão da altura do filé. Esse parâmetro foi calculado pelo software do equipamento (Exponent Lite Express, v 4.0, 13,0). A cor e a textura instrumental foram medidos aos 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias.

7.4.3.7 Degradação do ATP e seus catabólitos

Para esta análise nos períodos amostrais de (zero) 0; 0,13; 0,21; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias, foram retirados 1 g de músculo na parte dorsal de três filés esquerdos de cada tratamento. O músculo foi homogeneizado com 10mL de solução de ácido perclórico 0,6M com o auxílio do ultraturrax (IKA-T25) por 20 segundos a 18.000 rpm. A solução foi filtrada em papel filtro (Whatman nº1) e 600µL do filtrado foi retirado e adicionado a 600µL de solução tampão fosfato (pH 7,6) dentro de microtubos tipo ependorfe, os quais foram centrifugados por 3 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer para o momento da leitura. A leitura foi realizada de acordo com Burns et al. (1985), em cromatógrafo líquido de alta precisão (High Precision Liquid Chromatography) HPLC, a fase móvel utilizada foi a solução de KH_2PO_4 a 0,6 M, operando com fluxo de 1,4mL/min em uma coluna analítica de fase reversa (RP8MPLC). Os padrões utilizados para obter a retenção de cada metabolito foram: Hipoxantina (Hx), Adenosina trifosfato (ATP), Adenosina monofosfato (AMP), Inosina monofosfato (IMP), e Inosina (INO), adquiridos na forma purificada (Sigma

Aldrich). O valor de K que expressa o estado de degradação foi calculado de acordo com Saito et al. (1959), pela seguinte equação:

$$K(\%) = \frac{[INO] + [Hx]}{[ATP] + [ADP] + [IMP] + [INO] + [Hx]} * 100$$

7.4.3.8 *Análise sensorial*

A avaliação sensorial foi realizada nos peixes inteiros e nos filés após a filetagem, em intervalos de 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias, foi realizada por seis pessoas habituadas a manipulação de peixes, de acordo com esquema oficial da União Europeia (Regulamento da União Europeia, CEE 103/76 modificado pelo Regulamento 2406/96), no qual estabelece quatro níveis de frescor que foram convertidos em valores numéricos, como mostra a Tabela 7.1.

Tabela 7.1 Níveis de qualidade do pescado de acordo com o Regulamento da União Européia.

Escores	Categoria
0	O = Deteriorado
1	B = Sem frescor, rançoso
2	A = Fresco
3	E = Extra fresco

7.4.3.9 *Análise microbiológica*

Foi realizada em três filés esquerdos de cada tratamento, dos quais retirou-se 25g de amostra dos filés e colocou em um saco bag esterilizado e adicionou-se 225 mL de água peptonada estéril e homogeneizou-se durante 2 minutos no aparelho Stomacher (Lab Blender 400). Na sequência realizaram-se as diluições decimais seriadas em 9 mL de água peptonada. O plaqueamento foi realizado em duplicata nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} utilizando o sistema rápido Compact Dry.

Para investigação de coliformes totais e fecais foram incubadas em meio Compact Dry EC por 24h de 35 a 37°C, quando verificadas colônias azuis (coliformes fecais) e de cor magenta (coliformes totais). A investigação de *Staphylococcus aureus*, foi realizada utilizando o mesmo procedimento descrito acima e quando foram encontradas colônias típicas de cor azul, realizou-se o teste da coagulase, retirando colônias típicas com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e transferiu-se para um tubo com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI). Incubou-se por 24h a 35°C, após 24h transferiu-se 0,2mL da cultura do Caldo BHI para um tubo esterilizado e adicionou-se 0,5mL de Coagu-plasma hidratado, incubou-se a 37°C e observou-se a cada hora se houve a formação de coágulo.

Para a investigação da *Salmonella sp* realizou-se o pré-enriquecimento da amostra, onde a solução de 225 mL de água peptonada com 25g de amostra permaneceram em estufa durante 24h de 35 a 37°C, posteriormente pipetou-se 0,1mL da amostra pré-enriquecida na placa sistema rápido Compact Dry SL e na sequência aplicou-se 1mL de água estéril na mesma placa, incubou-se por 24h de 41 e 43°C, após realizou-se a contagem.

Os procedimentos e a interpretação dos resultados foram realizados conforme recomendação do Manual Compact DRY®, sendo que para a contagem das colônias típicas investigadas neste estudo foram expressas em Log 10 de Unidades Formadoras de Colônias por grama (Log UFC/g) (AOAC, 2009).

7.4.4. Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos ao longo do tempo, para as análises de Rigor Mortis, contração do filé, pH ocular, pH muscular, ATP, ADP, AMP,IMP,INO,Hx, as quais foram realizadas em (0; 0,13; 0,21; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias), BNV, NNP e medida dielétrica aos (0; 1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias), para os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) e a textura instrumental (1; 7; 14; 18; 22 e 25 dias). Foi realizada análise de variância (ANOVA) com desdobramento de interação entre tratamento x tempo, com nível de significância a 5%. Quando ocorreram diferenças significativas entre as médias dos tempos foi realizado o estudo de regressão como polinômio de até 3° grau.

Foi aplicado o teste de TUKEY ao nível de 5% de significância, para comparar as médias dos tratamentos, utilizando o PROC GLIMMIX do SAS University Studio, versão 3.1 basic (2012/2014). A estatística da análise sensorial foi realizada com o teste de normalidade de D'Agostino, com análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial (avaliador x tempo) para cada tratamento e atributo avaliado. Foi aplicado o teste de TUKEY ao nível de 5% de significância.

7.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.5.1. Parâmetros de qualidade de água e insensibilização dos peixes.

Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados durante a aplicação dos métodos de insensibilização, choque térmico, anestésico e eletronarcose em tilápias do Nilo. Após a aplicação dos métodos, foi possível observar o comportamento dos peixes e monitorar o momento que ocorreu a insensibilização aparente na maioria dos animais (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 Parâmetros de qualidade de água durante a insensibilização dos peixes aplicando três métodos.

		Tratamentos		
		Anestésico	Choque térmico	Eletronarcose
T.I. (min)		30	24	1
T (°C)	Início	28	1,1	28
	Fim	27	1,5	27
OD (mg/L)	Início	5,8	7,9	5,2
	Fim	3,9	6,7	4,2
Cond (mS)	Início	0,015	0,011	0,702
	Fim	0,038	0,033	0,705
pH	Início	5,56	5,30	5,35
	Fim	5,50	5,80	5,75
Salinidade	Início	0,00	0,00	0,03
	Fim	0,00	0,00	0,03
T.I=tempo de insensibilização aparente, T(°C)=temperatura da água, OD=oxigênio dissolvido, Cond=condutividade elétrica da água.				

Em todos os métodos de insensibilização foi possível observar que os parâmetros de qualidade de água medidos no início e ao término da aplicação de cada tratamento apresentaram pequenas oscilações. No tratamento do choque térmico houve um aumento do pH de 5,30 para 5,8, da condutividade elétrica, 0,011 para 0,033mS, e da temperatura de 1,1 para 1,5°C. O oxigênio dissolvido apresentou uma redução de 7,9 a 6,7 mg/L, no entanto todos os parâmetros estavam dentro dos resultados esperados.

Na eletronarcose e no anestésico as temperaturas mantiveram-se semelhantes (no início 28°C e ao término da aplicação 27°C). O oxigênio dissolvido apresentou níveis adequados para a tilápia (KUBITZA, 2000) em ambos os tratamentos, variando de 5,35 a 5,75mg/L na eletronarcose e 5,56 a 5,50 mg/L para o anestésico. A salinidade para o tratamento da eletronarcose foi ajustava em 0,03% de forma proposital para melhorar a condutividade elétrica do meio, ajustada a 0,700µS/cm.

A insensibilização aparente foi constatada nos peixes no momento em que cessaram os batimentos operculares e houve a ausência da rotação dos olhos ao longo do eixo longitudinal. No tratamento da eletronarcose a imobilização dos peixes ocorreu de forma instantânea, no momento em que o campo elétrico foi estabelecido. Os animais expostos ao choque térmico apresentaram algumas tentativas de fuga nos primeiros minutos dentro da solução de água e gelo, e após 24 minutos foi constatado que todos os peixes estavam totalmente insensibilizados. No tratamento com anestésico os peixes apresentaram alguma tentativa de fuga, e após 5 minutos a maioria dos animais não apresentava qualquer sinal de movimento, a insensibilização de todos os peixes ocorreu após 30 minutos, de exposição.

Lambooij et al. (2002) insensibilizando enguias (*Anguilla anguilla*) e Lambooij et al. (2006), insensibilizando bagre (*Clarias gariepinus*) em água e gelo, observaram por eletroencefalograma (EEG), que nas duas espécies houve baixa atividade cerebral e não houve respostas a estímulos de dor, após a exposição dos peixes por 13 minutos em água e gelo.

Zampacavallo et al. (2014), insensibilizando robalo (*Dicentrarchus labrax*) com água e gelo observaram nos peixes um comportamento de natação durante os dois primeiros minutos. Na sequência ocorreu a perda de equilíbrio, onde os peixes encontravam-se na posição vertical com o seu abdômen exposto para

cima e a cabeça voltada para o fundo da caixa, e houve a redução dos batimentos operculares. Após 3 minutos todos os peixes estavam imóveis, mas reagindo a estímulos.

Panagiotis et al. (2013), avaliando o comportamento de robalo (*Dicentrarchus labrax*) em mistura de água e gelo, verificaram que os peixes perderam a consciência e a sensibilidade após 10 minutos de exposição. Foi possível verificar esse comportamento pela ausência da respiração, rotação dos olhos, e de resposta a estímulos dolorosos, bem como a perda de equilíbrio.

Na tabela 7.3 está apresentado o Valor – p de cada variável, obtido na análise de variância ANOVA com nível de significância de 5%.

Tabela 7.3 Valor - p, para cada variável avaliada entre os tratamentos, ao longo do tempo e interação de tratamento x tempo.

Variáveis	Valor – p		
	Tratamento	Tempo	Interação (tratamento x tempo)
Rigor mortis	0,4633	0,0001*	0,0617
pH muscular	0,0233*	0,0001*	0,0225*
pH ocular	0,2176	0,0001*	0,0034*
Medida dielétrica	0,4371	0,0025*	0,7045
Contração do filé	0,758	0,9922	0,4715
BNV	0,8077	0,0001*	0,0005*
NNP	0,106	0,0001*	0,0001*
Textura instrumental	0,8201	0,0001*	0,5961
Parâmetro L*	0,3809	0,0001*	0,0048*
Parâmetro a*	0,0116*	0,0001*	0,0868
Parâmetro b*	0,0326*	0,0001*	0,0851

* Indica a significância em nível de 5%, na análise de variância ANOVA

7.5.2. Rigor mortis

A evolução do rigor mortis apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para os tempos de estocagem. Entre os três tratamentos foi possível observar um comportamento dos dados semelhante ao longo do tempo, explicado por uma regressão e equação de terceiro grau (Figura 7.1). Aos 7 dias de estocagem, todos os peixes encontravam-se em rigor mortis pleno, e esse estado permaneceu durante 7 dias de estocagem, sendo que aos 14 dias de estocagem, todos os peixes já encontravam-se no estado de pós-rigor mortis.

Acerete et al. (2009), comparando procedimentos de abate: asfixia, CO₂ e asfixia em gelo, verificaram que o aparecimento do rigor mortis foi semelhante nos três métodos testados, alguns indivíduos asfixiados com gelo entraram no estado de rigor mortis pleno, mais rapidamente. Este fato provavelmente ocorreu devido ao alto consumo de energia do ATP em etapas que antecedem o abate, portanto o índice de rigor mortis pode ser um indicador do estado de estresse sofrido pelo animal no momento da sua morte.

A entrada no rigor mortis está associada ao processo de acidificação causada pela produção de ácido láctico no tecido muscular durante a fase que antecede a morte. A grande atividade física e o estresse prévio aos métodos de insensibilização/abate elevam o consumo das reservas de glicogênio muscular à custa do ATP (BAGNI et al., 2007).

Gasco et al. (2014), reportaram no abate utilizando o choque elétrico em tinca (*Tinca tinca*) valores para o rigor mortis de 83,96%, medidos às 24h após a insensibilização e foram bastante próximos aos encontrados nesse estudo para os três tratamentos. Parisi et al. (2002), abatendo robalo (*Dicentrarchus labrax*) com o choque térmico e estocando os peixes a 1°C, verificaram que os peixes mantiveram a sua condição de rigor mortis pleno durante 11 dias, entretanto os órgãos internos já demonstravam sinais de deterioração, enquanto os peixes conservados a 4°C demonstraram maiores perdas da qualidade na parte externa quando comparado com a interna.

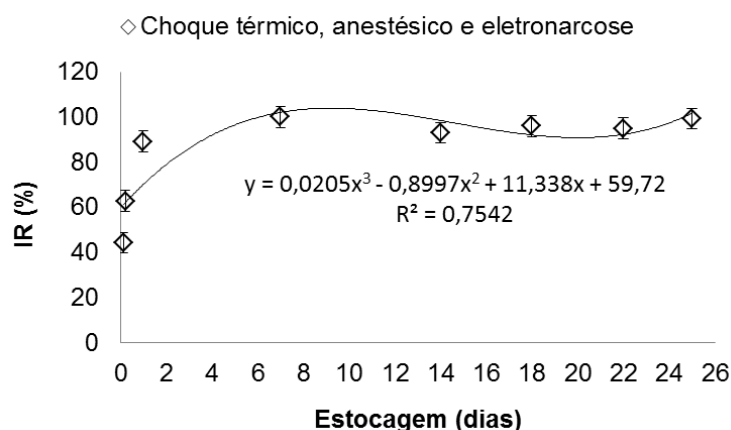


Figura 7.1 Índice de rigor mortis em tilápias do Nilo, insensibilizadas com choque térmico, anestésico e eletronarcose.

7.5.3. Medidas de pH muscular e pH ocular

O pH muscular apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, os tempos de estocagem e na interação tratamento x tempo. Na Figura 7.2 é possível observar o comportamento do pH ao longo do tempo para os três tratamentos, sendo que o estudo de regressão e as equações quadráticas, mostram o comportamento dos dados ao longo do tempo. No momento do abate, quando foram realizadas as primeiras medições dos valores de pH, foi observado que encontravam-se na faixa próxima a neutralidade (7,0) e após 1 dia de estocagem, os valores de pH muscular apresentaram uma redução de seus valores, concomitante com a instalação do rigor mortis. A partir dos 22 dias de estocagem, o pH muscular voltou a subir e esse aumento pode estar relacionado com os primeiros sinais de atividade de microrganismos deterioradores no músculo.

Roth et al. (2012), também observaram quedas nos valores de pH muscular em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) insensibilizando com percussão craniana e eletronarcose, constataram que ocorreu a entrada do estado de rigor mortis 3h, após o abate.

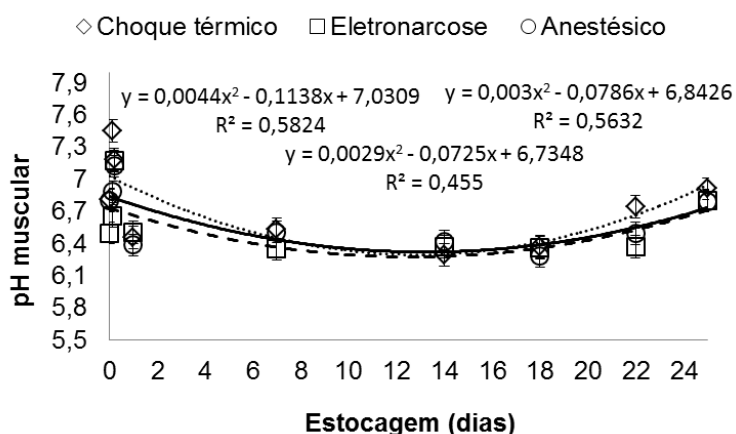


Figura 7.2 Médias do pH muscular em tilápia do Nilo resfriada a 4°C e estocadas durante 25 dias.

De acordo com Poli et al. (2005), o estresse severo em etapas que antecedem o abate, esgotam as reservas energéticas do músculo, produzindo mais ácido láctico e reduzindo o pH muscular. Pedrazzani et al. (2009),

insensibilizando tilápias do Nilo por secção da medula e termonarcose, verificaram que valores iniciais de pH muscular estavam elevados 7,2 e 7,3. Após três horas do abate, os valores decresceram e permaneceram na faixa de 6,6 a 6,9 durante dez horas.

Duran et al. (2008), abatendo trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e carpas (*Cyprinus carpio*) encontraram valores iniciais de pH muscular aplicando o método de percussão craniana entre 6,46 e 6,81 e asfixia entre 6,37 e 6,72, em trutas e carpas, respectivamente. Após 24h de abate, observaram que ocorreram reduções nos valores de pH muscular nos dois tratamentos, devido ao acúmulo de ácido láctico no músculo.

Sattari et al. (2010), atordoando claresse (*Heteroclarias sp.*) e bagre africano (*Clarias gariepinus*) encontraram valores de pH muscular muito similares aos observados neste estudo com tilápia. Os peixes atordoados com o choque elétrico apresentaram em 0 e 24h um decréscimo no valor de pH de 6,97 para 6,57. Matos et al. (2010), testando diferentes métodos de insensibilização em dourada (*Sparus aurata*), observaram valores de pH mais elevados no momento do abate, para o anestésico e choque térmico (6,54 e 6,67), em relação à mesma medida tomada às 48h após o abate (6,41 e 6,35), respectivamente. Lefèvre et al. (2008) reportaram que a redução do pH muscular em peixes ocorre entre 24 e 48 horas pós-morte.

O pH medido no líquido ocular foi realizado com o objetivo de complementar a mensuração do pH muscular. Acredita-se que essa medida pode ser um indicador de deterioração do pescado (PARISI et al., 2002; POLI et al., 2005). Na Figura 7.3, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de estocagem e na interação tratamento x tempo. Observou-se que os valores de pH ocular, encontram-se elevados no momento do abate, apresentando valores próximos a neutralidade.

Aos 7 e 14 dias de estocagem, ocorreu um decréscimo nos valores do pH ocular, comportamento semelhante ao observado no pH muscular. Essa redução simultânea pode ser explicada devido à entrada no estado de rigor mortis. A medida que o tempo de estocagem avançava aos 18, 22 e 25 dias foi possível observar um aumento nos valores do pH ocular, chegando a valores próximos a neutralidade, onde provavelmente esse aumento tenha ocorrido em função da atividade microbiana e das reações de autólise no globo ocular.

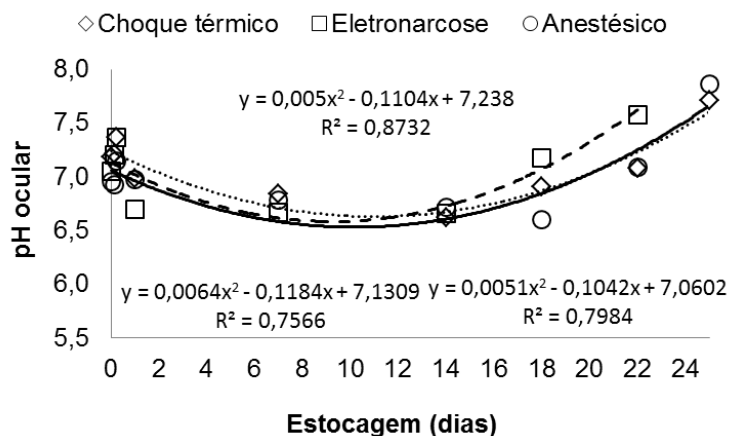


Figura 7.3 Médias do pH ocular de tilápias do Nilo, resfriadas a 4°C e estocadas por 25 dias.

De acordo com o estudo de Vargas et al. (2013), aplicando diferentes métodos de insensibilização em matrinhã (*Brycon cephalus*), as medidas de pH ocular tomadas no momento do abate apresentaram valores elevados para o tratamento da eletronarcose (7,27) e choque térmico (7,00). Ao longo do tempo de estocagem houve reduções nos valores do pH ocular. Parisi et al. (2002), realizando medições de pH ocular em robalo (*Dicentrarchus labrax*), observaram que houve diferenças entre o pH muscular (6,52) em relação ao ocular (6,71) que apresentou valor mais elevado.

No estudo de Zampacavallo et al. (2014), na qual foram aplicados diferentes métodos de insensibilização em robalo (*D. labrax*), os valores de pH ocular foram elevados no momento do abate (0h) para os tratamentos de choque térmico (7,48) e eletronarcose (7,48), e nas primeiras horas após o abate 3h, 5h e 24h ocorreu um decréscimo nos valores de pH para o choque térmico (7,17; 7,05; 6,64) e a eletronarcose (7,02; 6,92 e 6,70), respectivamente.

7.5.4. Medidas dielétricas

A medida dielétrica ou impedância é a técnica aplicada para avaliar o frescor da carne de peixes (VIDACEK et al., 2012), medida com o Torrymeter, um

equipamento que realiza de forma rápida e precisa, a leitura da medida elétrica, além de ser portátil e de fácil aquisição, facilita o trabalho de campo (ZHU et al., 2012). Realiza a medição da atividade celular numa escala de leitura centesimal e permite correlacionar as propriedades dielétricas com o frescor do músculo. Quando ocorre um aumento de fluidos corporais provenientes de deterioração do tecido, o índice dielétrico apresenta redução (PARISI et al., 2002).

A medida dielétrica apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos tempos de estocagem como mostra a Figura 7.4. Observou-se um comportamento semelhante entre os três tratamentos ao longo do tempo, explicado por uma equação linear, onde valores medidos nas primeiras horas apresentaram-se mais elevados, indicando que o grau de frescor dos peixes estava alto. À medida que transcorreu o tempo de estocagem dos peixes, ocorreu uma redução do frescor, sendo constatada pela queda nos valores da medida dielétrica.

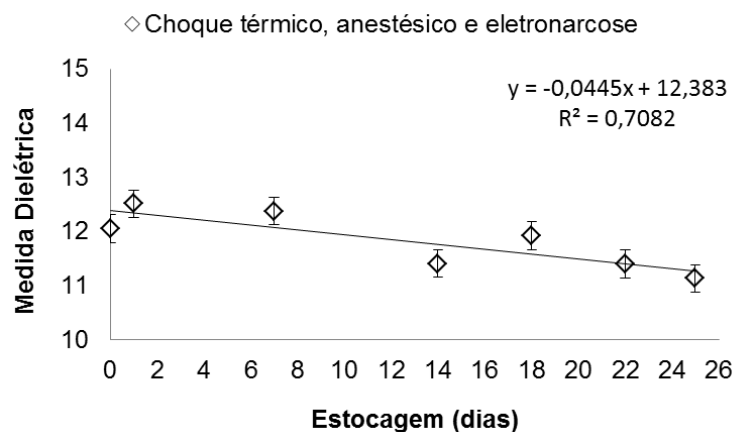


Figura 7.4 Valores médios da medida dielétrica no músculo da tilápia do Nilo resfriada durante 25 dias.

Ochrem et al. (2014), avaliando o frescor através da medida dielétrica em carpa capim (*Cyprinus carpio*) eviscerada e não eviscerada e mantida resfriada por 10 dias, constataram que não foram verificadas diferenças significativas entre as duas formas de armazenamento.

Alguns autores sugerem que muitos fatores podem interferir nas medições realizadas pelo Torrymeter, podendo mostrar dados equivocados, principalmente

em peixes descongelados ou armazenados em água com elevados teores de sal ou em água gelada (OEHLenschÄGER e NESVADBA, 1997).

7.5.5. Índice de alteração dos filés

A alteração do filé “*post mortem*” é um processo que ocorre quando os níveis de ATP no músculo estão em fase de esgotamento e os filamentos proteicos da actina e miosina ligam-se de forma permanente e ocorre a formação do complexo de actomiosina, que é uma associação irreversível entre a actina e a miosina, tornando o músculo inestendível (PEARCE et al., 2011).

Os três métodos de insensibilização apresentaram percentual de contração e a expansão dos filés, semelhantes, não apresentando diferenças significativas ($p>0,05$), entre os tratamentos, os tempos de estocagem e na interação tratamento x tempo, tanto para o comprimento quanto para a largura dos filés. A porcentagem de contração aumenta à medida que reduz o comprimento e aumenta a largura do filé, medido ao longo do tempo. Valores médios de porcentagem de contração e expansão encontradas nesse estudo para os três tratamentos foram de $2,60\pm 2,35\%$.

Santos (2013) utilizando diferentes métodos de insensibilização em tilápia do Nilo observaram variações nas porcentagens de contração dos filés, nos tratamentos da eletronarcose 3,39% e do choque térmico 6,15%. Vargas et al. (2013), encontraram valores elevados de contração do filé 9,08% de matrinhã (*Brycon cephalus*) abatidos pelo choque térmico. Skjervold et al. (2001), utilizando o CO₂ como método de abate em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) verificaram que a contração dos filés variou entre 8 a 15%. De acordo com Santos (2008), o músculo branco de peixes pode contrair-se até 15% em relação ao seu tamanho inicial.

7.5.6. Bases Nitrogenadas Voláteis e Nitrogênio Não Protéico

Determinação de Bases Nitrogenadas Voláteis tem sido uma medida utilizada como indicador de qualidade dos produtos pesqueiros armazenados em

gelo. Quantificam os compostos voláteis básicos como a amônia, metilamina, dimetilamina, trimetilamina entre outros (RAWDKUEN et al., 2010).

As bases nitrogenadas voláteis foram investigadas em filés resfriados de tilápia do Nilo e diferenças significativas ($p < 0,05$) ocorreram para os tempos de estocagem e para a interação tratamento x tempo. Os valores de BNV quantificados nos filés (Figura 7.5) apresentaram um comportamento semelhante nos três tratamentos, que pode ser explicado por equações de primeiro e terceiro grau. No primeiro dia após o abate, os valores de BNV apresentavam-se elevados, nos tratamentos de choque térmico (11,18), anestésico (14,54) e eletronarcose (14,65 mg/100g) apresentando uma tendência à redução do conteúdo de BNV ao longo do tempo de estocagem, que podem ser interpretadas em decorrência da lixiviação dos compostos nitrogenados de acordo com o método de insensibilização aplicado ou pelo armazenamento refrigerado dos peixes.

De acordo com Jesus et al. (2001), o conteúdo de BNV tem sido utilizado para estimar objetivamente a qualidade do pescado, onde espera-se que à medida que as contagens microbianas sejam mais elevadas, os valores de BNV também aumentam.

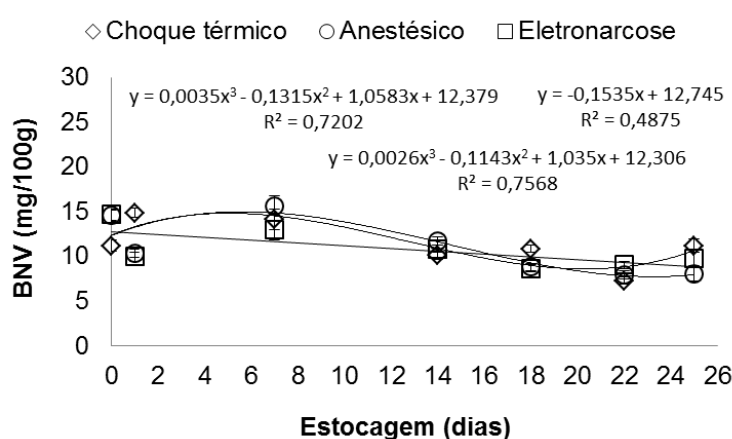


Figura 7.5 Valores de BNV (mg/100g de filé) de tilápia do Nilo resfriada a 4°C e estocada por 25 dias

De acordo com Ogawa e Maia (1999), peixes com excelente estado de frescor, os teores de BNV variam entre 5 a 10mgN/100g, peixes com frescor razoável podem atingir 15 a 25 mgN/100g, e 30 a 40 mgN/100g mostram o início do estado de putrefação, e em níveis acima de 50 mgN/100g o pescado encontra-se deteriorado. A Legislação Brasileira designa que o pescado fresco destinado para o consumo humano deve apresentar limite máximo de 30 mgN/100g de BNV (ANVISA, 2000). Os resultados do presente estudo estão abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação.

No estudo de Leitão et al (1997), avaliando alterações químicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e mantidos estocados a 5°C durante 21 dias, observaram que níveis de BNV no dia zero estava a 17,66mgN/100g e aos 7 dias esses níveis sofreram uma redução de 13,33mgN/100g e aos 21 dias de armazenamento os níveis voltaram a subir, chegando a 22,38mgN/100g. A justificativa para tais oscilações ocorreu em função da atividade microbiana e pela deterioração sofrida no muco superficial ao invés do tecido muscular.

Santos (2013) investigando o frescor em filés de tilápia do Nilo verificou que no dia zero os níveis de BNV estavam elevados nos tratamentos de choque térmico (22mgN/100g), eletronarcose (24mgN/100g), e CO₂ (23mgN/100g), e aos 7 dias de estocagem os níveis dos três tratamentos sofreram reduções de 15,2, 23,5 e 16mgN/100g, respectivamente. Aos 18 dias de armazenamento, os níveis de BNV sofreram reduções nos três tratamentos chegando a valores muito similares de 13mg/100g. Esse comportamento dos dados é bastante semelhante ao observado no presente estudo com a tilápia do Nilo.

Na Figura 7.6 encontram-se os valores encontrados para Nitrogênio Não Protéico (NNP), nos quais diferenças significativas ($p < 0,05$) ocorreram entre os tempos de estocagem, e na interação tempo x tratamento. No dia do abate os níveis de NNP encontravam-se bastante elevados para os tratamentos, choque térmico (340mg/100g), anestésico (397mg/100g) e eletronarcose (385mg/100g), e observou-se que ao longo do tempo de estocagem, ocorreram reduções nos teores de NNP, devido a lixiviação de compostos nitrogenados que ocorreu nos peixes ao longo da estocagem.

Segundo Contreras-Gusmán (1994) os níveis de NNP para peixes de água doce normalmente oscilam entre 300 a 350mg, portanto são valores muito próximos aos relatados nesse estudo.

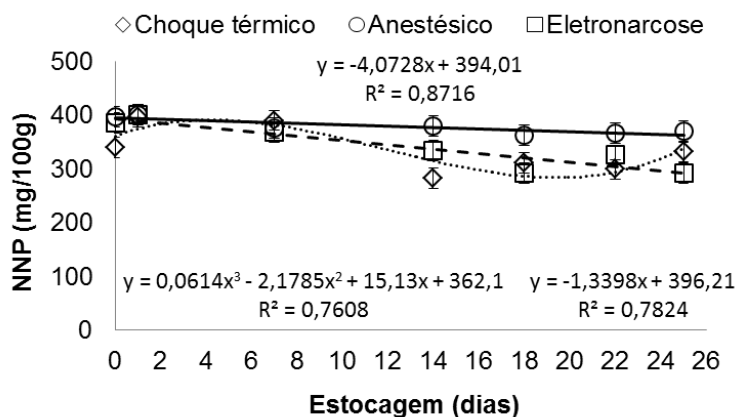


Figura 7.6 Valores de NNP(mg/100g) em filés de tilápia do Nilo resfriada a 4°C e submetidas a diferentes métodos de insensibilização.

Estudos realizados com tilápia do Nilo, mostram que valores de NNP logo após o abate (294 mg/100g), quando comparado com o período de estocagem de 21 dias, apresentaram uma redução, atingindo níveis de 208mg/100g (NETTO, 1984). Em outro estudo realizado com tilápia do Nilo, observou-se que valores de NNP chegaram a 344 mg/100g NNP, logo após o abate e após 16 dias de refrigeração, os níveis reduziram a 258 mg/100g (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

7.5.7. Textura Instrumental

A textura (Figura 7.7) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no tempo de armazenamento. O mesmo comportamento dos dados foi observado nos três métodos de insensibilização, sendo que em 24h ocorreram as maiores forças de compressão nos filés e ao longo do tempo de estocagem houve uma redução na força de compressão.

Santos (2013), avaliando a textura em filés de tilápia do Nilo, relatou que valores de força de compressão foram mais elevados nas primeiras 24 horas para

peixes insensibilizados com choque elétrico (22,28N), CO₂ (22,74N) e choque térmico (29,70N) em relação a força aplicada nos filés aos 26 dias de estocagem (20,18), (20,72) e (13,30N), respectivamente. Santos (2008) avaliando filés de linguado (*Psetta maxima*) observaram que a força de compressão apresentou uma tendência à redução com o tempo de armazenamento. Esse resultado demonstra que à medida que o tempo de estocagem avança, inicia-se a degradação do músculo, tornando-o mais mole e com menor resistência a compressão.

Merkin et al. (2014), atordoando salmão do Atlântico (*Salmo salar*) com diferentes métodos, observaram que o armazenamento dos filés contribuiu para que houvesse uma redução na força de compressão dos filés, analisada ao longo dos 3, 4, 5 e 6 dias, onde valores foram de 23,9N, 23,2N, 21,4N, e 20,4N, respectivamente. Rawdkuen et al. (2010), realizando testes de compressão nos filés de catfish (*Pangasianodon gigas*), refrigerados durante 14 dias, observaram que ao longo do tempo de estocagem, houve uma redução na força de cisalhamento, medidos na parte dorsal dos filés, (140N), (63N) e (58N) medidos aos 0, 7 e 14 dias, respectivamente.

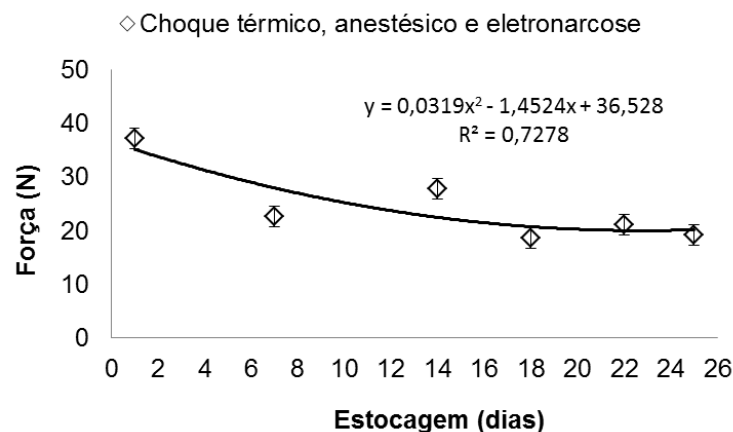


Figura 7.7 Força de compressão nos filés resfriados de tilápia do Nilo.

Suárez-Mahecha et al. (2007) verificando a textura no músculo de matrinxã (*Brycon cephalus*) relataram que o amolecimento da carne é um indicador do processo de deterioração, causado pela degradação do tecido

conectivo. Através da análise histológica realizada nos filés, observaram que ocorreram perdas da arquitetura da fibra muscular e degradação do colágeno após 12 horas de estocagem a (-3°C) coincidindo com perdas significativas da textura.

7.5.8. Coloração do filé

Para os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) realizou-se um estudo de regressão, entretanto, nenhum dos modelos aplicados representou a maioria dos dados obtidos, portanto eles foram expressos na forma de tabela.

A intensidade do parâmetro a^* (verde ao vermelho) e do valor b^* (azul ao amarelo), apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e ao longo do tempo de estocagem. Para o valor de a^* (Tabela 7.4) é possível observar um comportamento semelhante entre os três tratamentos, embora a eletronarcose tenha apresentado a intensidade da cor vermelha mais elevada em seus filés aos 18, 22 e 25 dias de armazenamento quando comparados ao choque térmico e o anestésico. Para o valor de b^* foi possível verificar menores intensidades da cor amarela no primeiro dia de estocagem (Tabela 7.5).

Tabela 7.4 Média da intensidade da cor a^* , em filés de tilápia resfriados a 4°C e armazenados por 25 dias.

Estocagem (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico ^B	Anestésico ^B	Eletronarcose ^A
1	0,23±0,47 ^{abc}	-0,86±0,47 ^{abc}	-0,97±0,47 ^{abc}
7	-0,94±0,47 ^{bc}	-1,25±0,47 ^{bc}	-0,20±0,47 ^{bc}
14	-1,96±0,47 ^c	-1,39±0,47 ^c	-1,29±0,47 ^c
18	-0,77±0,47 ^{abc}	-0,68±0,47 ^{abc}	0,25±0,47 ^{abc}
22	-0,23±0,47 ^a	-0,22±0,47 ^a	1,77±0,47 ^a
25	-0,51±0,47 ^{ab}	-0,74±0,47 ^{ab}	0,77±0,47 ^{ab}

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Média ± erro padrão

A partir dos 7 dias de armazenamento, ocorreu um aumento da intensidade da cor amarela nos filés e esse comportamento permaneceu crescente até os 25 dias de estocagem, demonstrando valores mais expressivos para o tratamento da eletronarcose.

Tabela 7.5 Média da intensidade da cor b*, em filés de tilápia resfriados a 4°C e armazenados por 25 dias

Estocagem (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico ^B	Anestésico ^{AB}	Eletronarcose ^A
1	3,5±0,5 ^{abc}	4,4±0,5 ^{abc}	4,4±0,5 ^{abc}
7	5,7±0,5 ^{bc}	5,3±0,5 ^{bc}	6,2±0,5 ^{bc}
14	4,3±0,5 ^{cd}	4,8±0,5 ^{cd}	5,3±0,5 ^{cd}
18	7,3±0,5 ^a	6,8±0,5 ^a	7,2±0,5 ^a
22	6,6±0,5 ^a	6,0±0,5 ^a	8,8±0,5 ^a
25	5,4±0,5 ^{ab}	5,6±0,5 ^{ab}	7,9±0,5 ^{ab}

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Média ± erro padrão

Para a luminosidade (L^*), houve diferença significativa ($p<0,05$), ao longo do tempo de estocagem, e na interação tempo x tratamento em filés de tilápia mantidos resfriados a 4°C (Tabela 7.6).

Tabela 7.6 Valores médios das intensidades de L^* , em filés de tilápia resfriados a 4°C durante 25 dias de armazenamento.

Estocagem (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico ^B	Anestésico ^{AB}	Eletronarcose ^A
1	53,3±1,1 ^{bc}	57,2±1,1 ^{bc}	57,6±1,1 ^{bc}
7	53,5±1,1 ^c	52,9±1,1 ^c	54,0±1,1 ^c
14	58,6±1,1 ^b	55,3±1,1 ^b	56,0±1,1 ^b
18	62,4±1,1 ^a	60,7±1,1 ^a	58,7±1,1 ^a
22	56,6±1,1 ^{bc}	53,7±1,1 ^{bc}	53,3±1,1 ^{bc}
25	56,6±1,1 ^b	59,3±1,1 ^b	55,1 ±1,1 ^b

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Média ± erro padrão.

A luminosidade investigada nos filés dos peixes submetidos ao choque térmico, e avaliados após 1 dia de congelamento apresentavam-se mais escuros, pelo menor valor de L^* (53,2), em relação ao anestésico (57,2) e a eletronarcose (57,5). Ao longo do tempo de estocagem, os filés dos três tratamentos, demonstraram aumento gradativo dos valores L^* aos 14 e 18 dias de estocagem para o choque térmico (62,4), anestésico (60,7) e a eletronarcose (58,7), os quais demostram sinais de opacidade no filé.

Bjørnevik e Solbakken (2010), avaliando filés de bacalhau (*Gadus morhua*) submetidos ao efeito do estresse e sem estresse, observaram que no dia do

abate e após 8 dias de armazenamento, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para o parâmetro de luminosidade.

A perda de intensidade da cor nos filés pode estar correlacionada com a temperatura de armazenamento e a bioquímica do tecido. Mostrando que a análise da cor pode ser uma poderosa ferramenta para indicar o estado metabólico pós-morte que se encontram os tecidos (TUCKEY et al., 2012).

Em um experimento com filés resfriados de pargo (*Pagrus auratus*) pesquisadores observaram que para os três parâmetros (L^* , a^* b^*) ocorreu queda nos valores, seguido de aumento progressivo ao longo do período de armazenamento. A luminosidade (L^*) apresentou redução em 48h, o parâmetro (a^*) apresentou redução da intensidade de vermelho após 72h, e o (b^*) apresentou um declínio entre 48-72h após o armazenamento (TUCKEY et al., 2012).

7.5.9. Degradação do ATP e seus catabólitos

De acordo com Ogawa e Maia (1999) a decomposição da adenosina trifosfato (ATP), é considerada um indicador de frescor bastante confiável, e logo após a morte do animal, ocorre a decomposição do ATP a ADP, AMP, IMP, Hx.

Neste estudo o ATP investigado no músculo das tilápias nas primeiras horas após o abate, (0, 3 e 5h), não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os três tempos investigados. Portanto as médias de cada tratamento são representadas na Figura 7.8.

De acordo com Zampacavallo et al. (2014) testando diferentes métodos de insensibilização e abate em robalo (*D. labrax*) o tratamento de choque térmico apresentou altos valores de ATP muscular no momento do abate, podendo demonstrar que foi o tratamento que causou menor sofrimento e estresse aos peixes. Portanto para o estudo com tilápia do Nilo, foi possível perceber que o tratamento com anestésico apresentou os maiores níveis de ATP muscular no momento do abate e estes níveis permaneceram elevados até às 3h, demonstrando ter sido o método de insensibilização que pode ter causado menor estresse e sofrimento aos peixes.

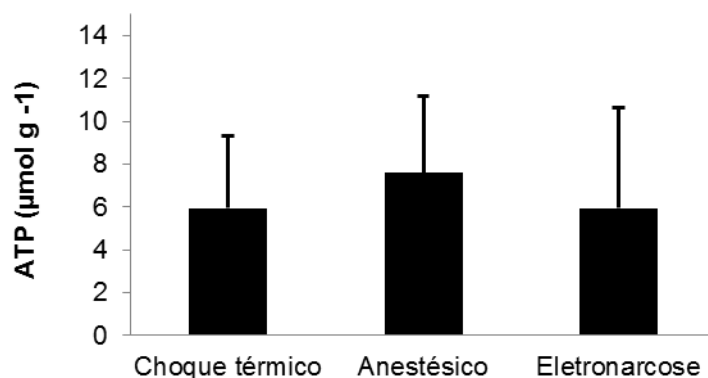


Figura 7.8 Valores de ATP muscular, investigado nas primeiras horas após o abate (0, 3 e 5h) em tilápia do Nilo refrigerada a 4°C

Em 24h após o abate os tratamentos choque térmico e eletronarcose mantiveram níveis de ATP elevados (11,03 μmol/g) e (12,05μmol/g), respectivamente, sendo que o tratamento anestésico continuou apresentando reduções dos níveis, chegando a 3,80μmol/g, como mostra a Figura 7.9 A

Zampacavallo et al. (2014) encontraram em robalo (*Dicentrarchus labrax*), comportamento bastante semelhante a esse estudo com tilápia, para os níveis de ATP no momento do abate (0h), onde os valores que foram mais elevados para o choque térmico (8,13) e eletronarcose (3,53μmol/g) e à medida que avançava as horas de estocagem, esses níveis foram reduzidos 4,93, e 9,10μmol/g em 3 horas e a 3,96 e 0,22μmol/g às 5 horas após o abate, respectivamente. De acordo com Poli (2009) o esgotamento progressivo das reservas de ATP está correlacionado com o aparecimento gradual do rigor mortis. Portanto através da taxa de rigor mortis nas primeiras horas após o abate podem ser reveladas algumas informações sobre o estado de estresse sofrido pelos peixes antes do abate. No presente estudo, os três tratamentos apresentaram seus níveis de ATP, bastante reduzidos aos 7 dias de estocagem (Figura 7.9A) no qual coincide com a entrada no estado de rigor mortis.

Os níveis de ADP e AMP (Figura 7.9B e 7.9C) não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) ao longo do tempo, permaneceram elevados nas primeiras horas após o abate, apresentando ligeiro decréscimo em 24h que foi estendido até 7dias com uma redução ainda maior, chegando a níveis próximos de zero, e permaneceram baixos até os 25 dias de estocagem. O IMP não

apresentou diferença significativa ($p>0,05$) ao longo do tempo e apresentou níveis elevados em 0h e 3h para o choque térmico (2,27) e o anestésico (1,27 $\mu\text{mol/g}$), apresentando reduções dos níveis em 5h e 24h para os três tratamentos, como mostra a Figura 7.9D. Foram observados aos 7 e 18 dias valores mais elevados de IMP para o choque térmico, anestésico e a eletronarcose.

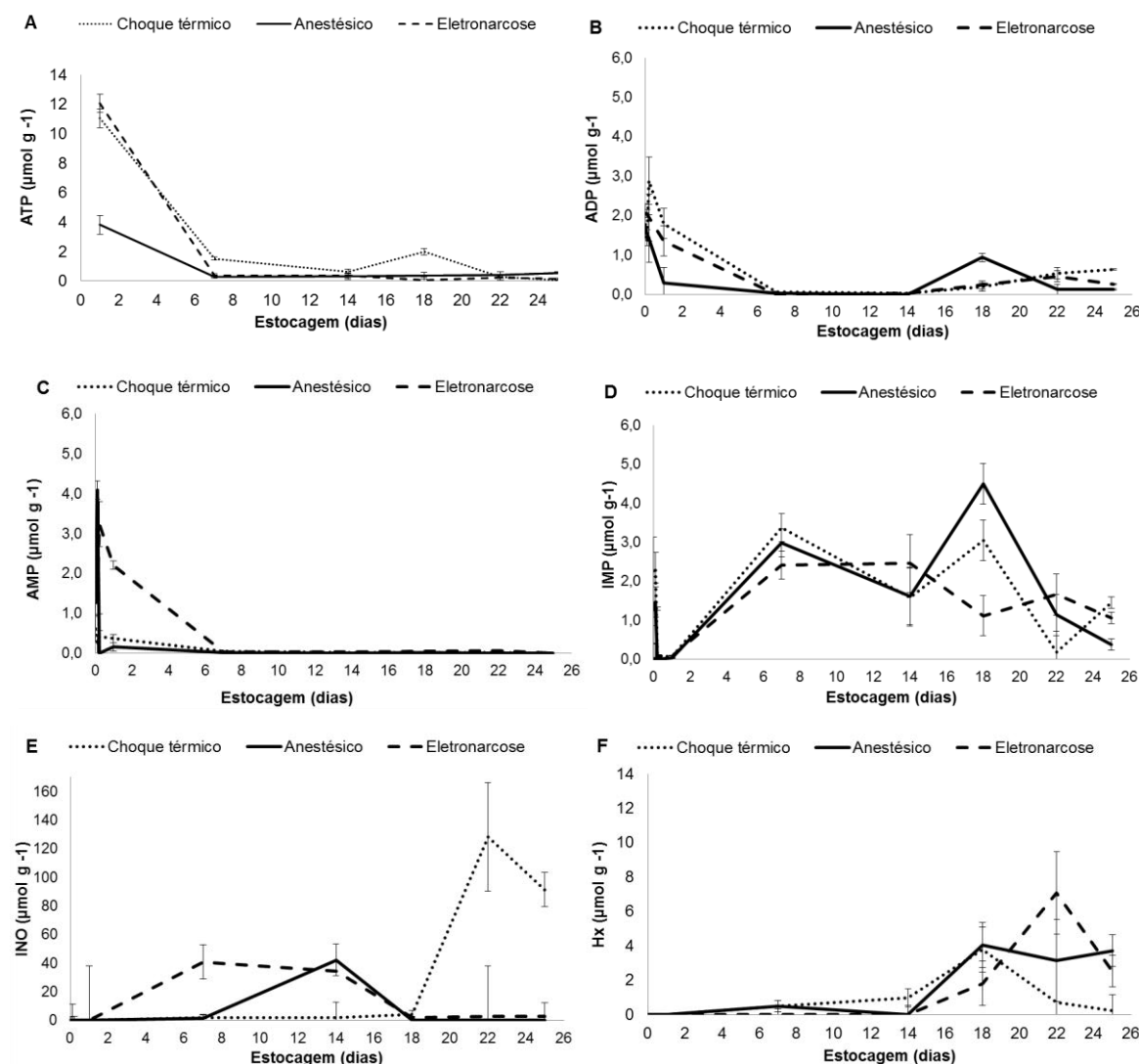


Figura 7.9 Degradação do ATP (A) e seus catabólitos ADP (B), AMP (C), IMP (D), INO (E), Hx (F) no músculo da tilápia do Nilo insensibilizada e refrigerada a 4°C.

A inosina (INO) apresentou diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de estocagem e a hipoxantina (Hx) não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) ao longo do tempo (Figura 7.9E e 7.9F). Na inosina foram detectadas pequenas

quantidades aos 7 dias de estocagem, ocorrendo algumas variações ao longo do tempo. Os maiores picos de inosina foram observados aos 22 dias, no choque térmico ($128\mu\text{mol/g}$), e no anestésico aos 14 dias, ($42\mu\text{mol/g}$), e para a eletronarcose aos 7 dias, ($40\mu\text{mol/g}$). De acordo com Beuchat (1973), a hipoxantina é considerado um índice de determinação da qualidade de pescado de água doce. O aparecimento da hipoxantina indica o início da deterioração microbiológica e alterações autolíticas sofridas no músculo, portanto ela deveria ser utilizada como indicador de frescor no pescado, devido à sua boa correlação com o tempo de armazenamento (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011). O aparecimento da hipoxantina foi observado para os três tratamentos a partir dos 14 dias de estocagem, como mostra a Figura 7.9F.

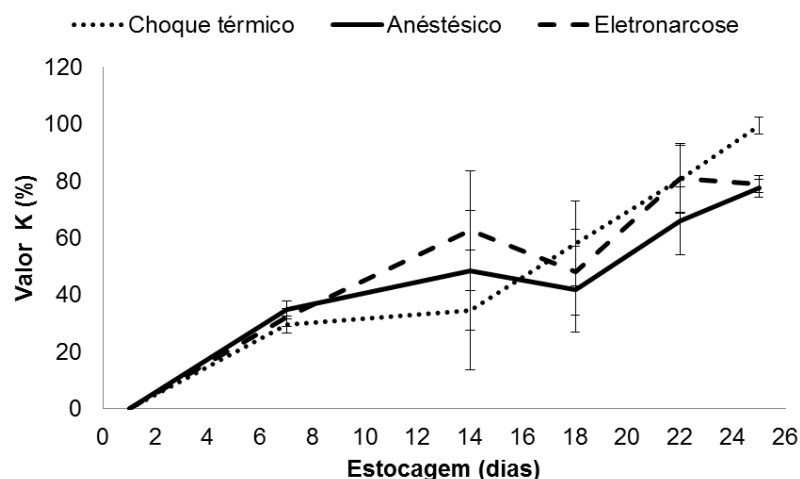


Figura 7.10 Índice K em filés de tilápia armazenados resfriados durante 25 dias.

O índice K determina o frescor em pescados, através da razão entre a hipoxantina (Hx) e o nível total de ATP e seus produtos da degradação (OGAWA e MAIA 1999). Alguns limites do valor K para a carne de peixes são tabelados, onde: < 5% peixes recém-mortos (sem sofrimento), < 20% pode ser ingerido cru como sushi e sashimi, 20 a 60% precisa ser aquecido para o consumo, 60 a 80 % mostra sinais de putrefação.

Para este estudo o índice K apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo de estocagem. O índice K apresentou valores iguais a zero do momento do abate até às 24h após a estocagem. Os primeiros valores foram observados aos 7 dias, como mostra a Figura 7.10 e os valores do índice K

aumentaram gradativamente durante o armazenamento atingindo valores elevados aos 14 dias, para a eletronarcose (62,44%), choque térmico (34,42%) e anestésico (48,43%) e aos 22 dias todos os peixes dos três tratamentos já demonstravam os primeiros sinais de putrefação, apresentando níveis acima de 60%.

O índice K apresentou um comportamento anormal para os tratamentos eletronarcose e anestésico aos 18 dias de armazenamento, mostrado através de uma queda dos seus valores. Este comportamento pode ser explicado devido a grande variabilidade no tamanho dos peixes, onde no momento da aplicação do choque elétrico a intensidade da corrente distribui-se de forma desigual em cada indivíduo, devido a não uniformidade de seus tamanhos comprometendo desta forma a homogeneidade das amostras.

Song et al. (2011), reportaram em wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) que o índice K no momento do abate encontrava-se a 5% para os peixes recém capturados. Hsieh et al. (2011), abatendo tilápias e acondicionando os peixes em refrigerador a 4°C verificaram que os valores de K iniciais foram de 23,64%, valor este bastante elevado, devido devido ao estresse sofrido pelos peixes antes do abate.

7.5.10. Análise sensorial

Para a análise sensorial de tilápias submetidas a diferentes métodos de insensibilização houve efeito significativo ($p < 0,05$) entre os tempos de estocagem. Na figura 7.11 estão os resultados das análises realizadas de acordo com o esquema da União Europeia. (Esquema baseado no Regulamento do CEE 103/76 e modificado pelo Regulamento EU 2406/96).

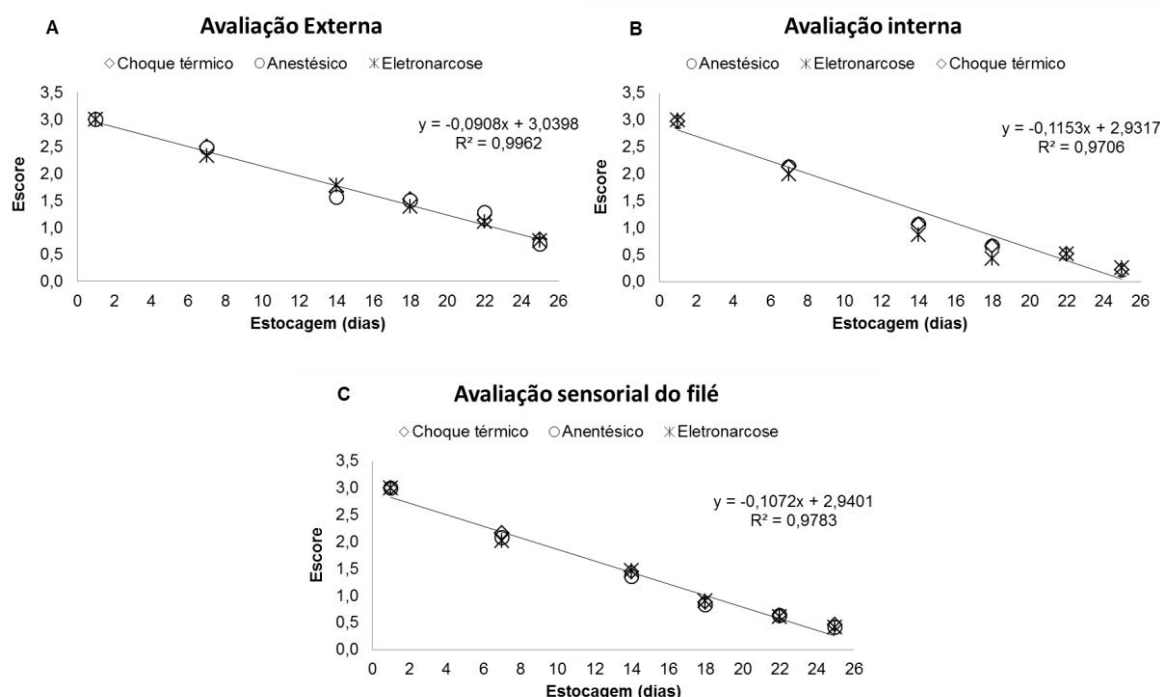


Figura 7.11 Avaliação sensorial externa (A), interna (B) e sensorial do filé (C) da tilápia do Nilo submetida a diferentes métodos de insensibilização.

Foram avaliados 12 atributos sensoriais na tilápia divididos em 3 grupos, onde 6 parâmetros foram realizados na parte externa do peixe (Figura 7.11A), a elasticidade da carne, odor da pele, odor das brânquias, aspecto da pele, aspecto das brânquias, aspecto dos olhos. No exame realizado na parte interna (Figura 7.11B) foram avaliados o odor da cavidade abdominal, aspecto dos órgãos, peritônio, coluna vertebral. Após a retirada do filé foi avaliado o aspecto da carne (luminosidade) e aspecto da cor (Figura 7.11C).

A avaliação interna, externa e o filé apresentaram um comportamento bastante semelhante ao longo do tempo de estocagem, indicando que até 7 dias, os peixes apresentaram a pontuação próxima de 2, enquadrando-se na classe de pescado fresco. A observação realizada aos 14 dias mostra que praticamente todos os parâmetros já estavam próximos do escore 1 classificado como sem frescor, rançoso. O frescor foi reduzindo à medida que o tempo de estocagem avançava chegando aos 25 dias ao estado classificado como deteriorado, portanto não podendo ser comercializável.

Hsieh et al. (2011), avaliando atributos sensoriais na tilápia do Nilo refrigerada a 4°C, observaram que o limite para a aceitação da tilápia armazenada foi de até 7 dias. Guizani et al. (2005), citam a importância de

realizar a avaliação sensorial na superfície do corpo, olhos, brânquias e abdômen dos peixes para avaliar o seu estado de frescor. Rodríguez et al. (2004), reportaram em pescada europeia (*Merluccius merluccius*) armazenada no gelo, boa qualidade sensorial até dia 12 de estocagem, e a partir dos 15 dias as amostras já apresentavam grande perda da qualidade.

Tononi (2011), reportou que o tempo médio de conservação de peixes no gelo é em torno de 7 dias, sendo que algumas espécies não resistem por mais de 48h e quando os peixes são devidamente eviscerados, podem resistir um tempo maior que 7 dias. Alguns parâmetros avaliados nos peixes são considerados bons indicadores de frescor, como o odor, muco e coloração das brânquias, a firmeza do abdômen e o formato dos olhos. Através destes parâmetros é possível observar as primeiras mudanças que ocorrem no pescado durante o armazenamento (SCHERER et al., 2005).

Scherer et al. (2005) avaliando sensorialmente a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) relataram parâmetros de frescor observados na coloração das brânquias, as quais apresentavam-se vermelho escuro, o odor era característico de peixe fresco e havia pouco muco na superfície do corpo. A coloração dos olhos estava clara e os olhos apresentavam-se com formato convexo. À medida que o tempo de estocagem avançava (16 dias), eles observaram alterações na coloração das brânquias, passando de vermelho escuro para marrom, os olhos apresentavam formato côncavo e o abdômen apresentava aspecto mole. Estes parâmetros sensoriais foram observados no presente estudo com tilápia do Nilo a medida que o tempo de estocagem avançava.

7.5.11. Microbiologia

Dentre os microrganismos investigados em filés de tilápia do Nilo, os que permaneceram ausentes durante todos os tempos amostrais foram a *Salmonella* sp, coliformes fecais e *Staphylococcus aureus*. Houve crescimento de colônias típicas de coliformes totais, embora a legislação brasileira atual não contemple esses microrganismos, a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) estabelece o padrão para avaliação de

coliformes mesófilos a 45° C, sendo no máximo 10^3 NMP/g⁻¹ para o pescado “*in natura*” refrigerado a (4°C) ou congelado a (-18° C). A investigação desses microrganismos ao longo do tempo auxilia no monitoramento de problemas de higiene e de manipulação do pescado, antes e durante o período de estocagem.

Agnese et al. (2001), relataram que valores de mesófilos aeróbios superiores a 10^6 UFC/g⁻¹ na carne de peixe é considerado um valor bastante crítico em relação ao frescor.

7.6. CONCLUSÕES

Os métodos de insensibilização testados, choque térmico, anestésico e eletronarcose apresentaram algumas diferenças entre parâmetros avaliados ao longo do tempo. Essas diferenças não foram relevantes a ponto de afetar o conjunto de todos os aspectos de qualidade da carne.

A eletronarcose foi o método de insensibilização que garantiu de forma instantânea a insensibilização dos peixes, garantindo condições de bem-estar durante procedimentos de abate realizados em tilápia do Nilo.

O escore de frescor, avaliado pela análise sensorial, demonstrou que os peixes apresentavam o aspecto de fresco até os 7 dias de armazenamento em gelo.

Algumas medidas de frescor como o ATP e a degradação de seus catabólitos e o valor K, foram semelhantes entre os tratamentos testados na tilápia do Nilo refrigerada.

As práticas de abate e processamento foram executadas de forma satisfatória e mantiveram a boa qualidade do músculo.

7.7. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa (CNPq n°475374/2012-6).

À CAPES pela bolsa concedida à aluna de doutorado.

À Universidade Degli Studi di Firenze, permitiu a doutoranda desenvolver parte da análise deste projeto.

7.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERETE, L., REIG, L., ALVAREZ, D., FLOS, R., TORT, L. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v.287(1-2), p.139–144, 2009.
- AGNESE, A. P., DE OLIVEIRA, V. M., SILVA, P. P. O., OLIVEIRA, G. A. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes fecais e totais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica-RJ. **Revista de Higiene Alimentar**, v.15, p.67-70, 2001.
- ANIL, M. H. Studies on the return of physical reflexes in pigs following electrical stunning. **Meat Science**, v.30(1), p.13–21, 1991.
- AOAC. Research Institute. Certificate of performance tested SM status. **Certificate nº 100401** - Nissui Compact Dry Yeast and Mould, Washington, 2009.
- BAGNI, M., CIVITAREALE, C., PRIORI, A., BALLERINI, A., FINOIA, M., BRAMBILLA, G., MARINO, G. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.263 (1-4), p. 52–60, 2007.
- BEUCHAT, L.R. Hipoxanthine measurement in assessing freshness of chilled channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal Agriculture Food Chemical**, v.21, n.3, p.453- 455, 1973.
- BITO, M., YAMADA, K., MIKUMO, Y., AMANO, K. Studies on rigor mortis of fish: 1. Differences in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's method. Bull. Tokai Reg. **Fisheries Reserch Laboratory**, v.109, p.89–96, 1983.
- BJØRNEVIK, M., SOLBAKKEN, V. Pre slaughter stress and subsequent effect on flesh quality in farmed cod. **Aquaculture Reserch**, v. 41, p.467–474, 2010.
- BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (**RIISPOA**), pescados e derivados 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda>>. Acesso em 10 agosto de 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2001. **Resolução RDC n. 12**, de 02 de janeiro de 2001 – Diário Oficial da União 10 de janeiro de 2001, seção 1.
- BURNS, G.B., KEE, P.J., IRVINE, B.B. Objective procedure for fish freshness evaluation based on nucleotide changes using a HPLC system. **Canadian Technical Reports of Fisheries and Aquatic Science**, nº1373, p.35, 1985.

- CIE - Commission Internationale de l'éclairage. **Recommendations on uniform colourspaces–colour equations, psychometric colour terms**. Paris: n.2 to CIE Publ. n.15 (E-1.3.L) 1971/9TC-1- 3, 1978.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
- DURAN, A., ERDEMLI, U., KARAKAYA, M., YILMAZ, M.T. Effects of slaughter methods on physical, biochemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) filleted in pre in or post rigor periods. **Fisheries Science**, v.74, p.1146–1156, 2008.
- EFSA - Scientific opinion of the panel on animal health and welfare on a request from the European Commission on welfare aspect of the main systems of stunning and killing of farmed sea bass and sea bream. **Journal European Food Safety Authority**. v.1010, p.1–52, 2009.
- GASCO, L., GAI, F., ROTOLO, L., PARISI, G. Effects of different slaughtering methods on rigor mortis development and flesh quality of tench (*Tinca tinca*). **Journal Applied Ichthyology**, v.30, p.58–63, 2014.
- GUIZANI, N., AL-BUSAIDY, M.A., AL-BELUSHI, I.M., MOTHERSHAW, A., RAHMAN, M.S. The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellow fin tuna (*Thunnus albacares*). **Food Research International**, v.38, p.215–22, 2005.
- HAUCK, F.R. Some harmful effects of the electro shocker on large rainbow trout. Trans. **American Fisheries Society Journal**, v.77, p.61–64, 1949.
- HOLLOWAY, A.C., KEENE, J.L., NOAKES, D.G., MOCCIA, R.D. Effects of clove oil and MSS- 222 on blood hormone profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Research**, v.35, p.1025–1030, 2004.
- HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington: 13^aed. D.C. AOAC, 1980.
- HOWGATE, P. **Determination of total volatile bases**. Torry Research Station. Aberdeen: Appendix 4 TD564, 1976.
- HSIEH, C. W., LAI, C. H., LEE, C. H., KO, W. C. Effects of high-voltage electrostatic fields on the quality of tilapia meat during refrigeration. **Journal of Food Science**, v.76, n.6, p.312-317, 2011.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods Microorganisms in foods, 2: sampling for microbiological analysis: principles and specific applications. London : 2^aed. Blackwell Scientific Publications, 1986.
- IVERSEN, M., FINSTAD, B., MCKINLEY, R.S., ELIASSEN, R.A. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and Benzoak® as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity.

- Aquaculture**, v.221, p. 549–566, 2003.
- JERRETT, A.R., STEVENS, J., HOLLAND, A.J., Tensile properties of white muscle in rested and exhausted chinook salmon (*Onchorynchus tshawytscha*). **Journal of Food Science**, v.61, p. 527–532, 1996.
- JESUS, R.S., LESSI, E., TENUTA-FILHO, A. Estabilidade química e microbiológica de “minced fish” de peixes amazônicos durante o congelamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v.21, n.2, p.144-148, 2001.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí : 1ª ed. 2000, 285p.
- LAMBOOIJ, E., VAN DE VIS, J.W., KLOOSTERBOER, R.J., PIETERSE, C. Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla Anguilla*) of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla anguilla* L.): neurological and behavioural assessment. **Aquaculture**, v.210, p.159–169, 2002.
- LAMBOOIJ, E., KLOOSTERBOER, R.J., GERRITZEN, M.A., VAN DE VIS, J.W. Assessment of electrical stunning in fresh water of African catfish (*Clarias gariepinus*) and chilling in ice-water for loss of consciousness and sensibility. **Aquaculture**, v.254, p.388–395, 2006.
- LAMBOOIJ, E., GRIMSBØ, E., DE VIS, J. W. VAN., REIMERT, H. G. M., NORTVEDT, R., ROTH, B. Percussion and electrical stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after dewatering and subsequent effect on brain and heart activities. **Aquaculture**, v.300 (1-4), p.107–112, 2010.
- LEFEVRÉ, F., BUGEON, J., AUPERIN, B., AUBIN, J. Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. **Aquaculture**, v. 284, p.81–89, 2008.
- LEITÃO, M.F.F., RIOS, D.P.F.A., GUIMARÃES, J.G.L., BALDINI, V.L.S., MAINARDES, C.S.R.P. Alterações químicas e microbiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração a 5°C. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.160 – 166, 1997.
- LINES, J. A., ROBB, D. H., KESTIN, S. C., CROOK, S. C., BENSON, T. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. **Aquacultural Engineering**, v.28 (3-4), p.141–154, 2003.
- LINES, J. KESTIN, S. Electrical stunning of fish: the relationship between the electric field strength and water conductivity. **Aquaculture**, v.241 (1-4), p.219–234, 2004.
- LINES, J., KESTIN, S. Electric stunning of trout: power reduction using a two-stage stun. **Aquacultural Engineering**, v.32 (3-4), p.483–491, 2005.
- MATOS, E., GONÇALVES, A., NUNES, M. L., DINIS, M. T., DIAS, J. Effect of

- harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality criteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.305(1-4), p.66–72, 2010.
- MERKIN, G. V., STIEN, L.H., PITTMAN, H., NORTVEDT, R. The Effect of stunning methods and season on muscle texture hardness in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) **Journal of Food Science** v.79, n.6, p. 1137-1141, 2014.
- MISIMI, E., ERIKSON, U., DIGRE, H., SKAVHAUG, A., MATHIASSEN, R. Computer vision- based evaluation pre- and post rigor changes in size and shape of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets during rigor mortis and ice storage: effects of “*post mortem*” handling stress. **Journal of Food Science**, v.72, p.S030–S035, 2008.
- MORZEL, M., VAN DE VIS, J.W. Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla anguilla* L.). **Aquaculture Research** v.34, p.1–11, 2003.
- MORZEL, M., SOHIER, D., VAN DE VIS, J.W. Evaluation of slaughtering methods of turbot with respect to animal protection and flesh quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.19–28, 2003.
- NETTO, F. M. **Modificações químicas, bioquímicas e sensoriais do híbrido de tilápia estocado em gelo**. 1984. 148 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP, Campinas, 1984.
- OCAÑO-HIGUERA, V., MAEDA-MARTINEZ, A., MARQUEZ-RIOS, E., CANIZALES-RODRIGUEZ, D., CASTILLO-YAÑEZ, F., RUIZ-BUSTOS, E., GRACIANO-VERDUGO, A., 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.
- OCHREM, A. S., ZAPLETAL, P., MAJ, D., GIL, Z., ZYCHLINSKA-BUCZEK, J. Changes in physical and dielectrical properties of carp meat (*Cyprinus carpio*) during cold storage. **Journal of Food Process Engineering**, v.37 p.177–184, 2014.
- OEHLENSCHÄGER, J., NESVADBA, P., Methods for freshness measurement based on electrical properties of fish tissue. Proceedings of the Final Meeting of the Concerted Action “Evaluation of Fish Freshness”, Nantes France, November 12– 14. **International Institute of Refrigeration**, p.363– 368, 1997.
- OGAWA. M; MAIA E.L. **Manual de Pesca: Ciência de Tecnologia do Pescado**. São Paulo : Livraria Varela, 1999, 429p.
- PANAGIOTIS, E.S., TSOPELAKOS, A., CHARISMIADOU, M. A., BATZINA, A., DELIGEORGIS, S. G., MILIOU, H. Comparison of the effects of six stunning/ killing procedures on flesh quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus

- 1758) and evaluation of clove oil anaesthesia followed by chilling on ice/water slurry for potential implementation in aquaculture. **Aquaculture Research**, p.1–12, 2013.
- PARISI, G., FRANCI, O., POLI, B. M. Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in refrigerated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during shelf life. **Aquaculture**, v. 214, p.153–167, 2002.
- PEARCE, K. L., ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H. J., HOPKINS, D. L. Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes a review. **Meat Science**, v.89, n.2, p.111–124, 2011.
- PEDRAZZANI, A. S., CARNEIRO, P. C. F., KIRSCHNIK, P. G., MOLENTO, C. F. M. Impacto negativo de secção de medula e termonarcose no bem-estar e na qualidade da carne da tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.188-197, 2009.
- POLI, B.M., PARISI, G., SCAPPINI, F., ZAMPACAVALLLO, G., Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. **Aquaculture International**, v.13, p.29–49, 2005.
- POLI, B. M. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. **Italian Journal of Animal Science**, v.8, p.139–160, 2009.
- RAWDKUEN S, JONGJAREONRAK A, PHATCHARAT S, BENJAKUL S. Assessment of protein changes in farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscles during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology** v.45, n.5, p.985–994, 2010.
- RIBAS, L., FLOS, R., REIG, L., MACKENZIE, S., BARTON, B. A., TORT, L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v.269 (1-4), p.250–258, 2007.
- ROBB, D.H.F. The relationship between killing methods and quality. In: KESTIN, S.C, WARRISS, P.D. **Farmed fish quality**. Oxford : Blackwell Science, 2001, 220–330p.
- ROBB, D.H.F., KESTIN, S.C., Methods used to kill fish: field observations and literature reviewed. **Animal Welfare**, v.11, p.269–282, 2002.
- ROBB, D. H., O' CALLAGHAN, M., LINES, J., KESTIN, S. Electrical stunning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): factors that affect stun duration. **Aquaculture**, v. 205 (3-4), p.359–371, 2002.
- ROBB, D. H., ROTH, B. Brain activity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following electrical stunning using various field strengths and pulse durations. **Aquaculture**, v.216 (1-4), p.363–369, 2003.

- RODRÍGUEZ, Ó., LOSADA, V., AUBOURG, S. P., BARROS-VELÁZQUEZ, J. Enhanced shelf-life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory analysis and assessment of microbiological activity. **Food Research International**, v.37, n.8, p.749–757, 2004.
- ROTH, B., IMSLAND, A., MOELLER, D., SLINDE, E. Effect of electric strength and current duration on stunning and injuries in market-sized Atlantic salmon held in seawater. **North American Journal of Aquaculture**, v. 65, p.8–13, 2004.
- ROTH, B., GRIMSBØ, E., SLINDE, E., FOSS, A., STIEN, L. H., NORTVEDT, R. Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and rigor mortis. **Aquaculture**, v.326-329, p.178–180, 2012.
- SAITO, T., ARAI, K., MATSUYOSHI, M. A new method for estimating the freshness of fish. Bull. **Japanese Society for the Science Fisheries**. v.25, p. 749–750, 1959.
- SANTOS, J. M. S. **Filetes de Pregado (*Psetta maxima*) Embalados em Atmosfera Modificada: Avaliação da qualidade física, química e microbiológica**. 2008, 170f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Porto, Porto, 2008.
- SANTOS, E.C. **Métodos de abate e qualidade da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2013. 97 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2013.
- SAS - University Studio. Versão 3.1 basic, 2012/2014.
- SATTARI, A., LAMBOOIJ, E., SHARIFI, H., ABBINK, W., REIMERT, H., VAN DE VIS, J. W. Industrial dry electro-stunning followed by chilling and decapitation as a slaughter method in Claessee® (*Heteroclinus* sp.) and African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v.302 (1-2), p.100–105, 2010.
- SCHERER, R., AUGUSTI, P.R., STEFFENS, C., BOCHI, V.C., HECKTHEUER, L.H., LAZZARI, R., RADUNZ- NETO, J., POMBLUM, S.C.G., EMANUELLI, T. Effect of slaughter method on “*post mortem*” changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) stored in ice. **Journal Food Science**, v.70, p.C348–C353, 2005.
- SKJERVOLD, P. O., FJÆRA, S. O., ØSTBY, P. B., ISAKSSON, T., EINEN, O., TAYLOR, R. Properties of salmon flesh from different locations on pre- and post-rigor fillets. **Aquaculture**, v.201 (1-2), p.91–106, 2001.
- SKJERVOLD, P.O.; FJÆRA, S.O.; ØSTBY, P.B. et al. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.192, p.265–280, 2002.

- SONG, Y., LIU, L., SHEN, H., YOU, J. LUO, Y. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). **Food Control**, v.22, p.608–615, 2011.
- SUÁREZ-MAHECHA, H., BEIRÃO, L., FRANCISCO, A., NAKAGHI, L. S. O., PARDO-CARRASCO, S. C. Efeito do resfriamento sobre a textura post-mortem da carne do peixe matrinxã (*Brycon cephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.1067–1073, 2007.
- TONONI, J.R. **Indústria do pescado**. Disponível em: <<http://vix.sebraees.com.br/arquivos/biblioteca/Industria%20do%20Pescado.pdf>> Acesso em 10 outubro de 2014.
- TUCKEY, N. P. L., FORGAN, L. G., JERRETT, A. R. Fillet colour correlates with biochemical status in Australasian snapper (*Pagrus auratus*) during storage in refrigerated seawater. **Aquaculture**, v.356-357, p.256–263, 2012.
- VAN DE VIS, H., KESTIN, S., ROBB, D., OEHLenschLAGER, J., LAMBOOIJ, B., MUNKNER, W., NESVADBA, P. Is humane slaughter of fish possible for industry? **Aquaculture Research**, v.34, n.3, p.211–220, 2003.
- VARGAS, S. C., OLIVEIRA FILHO, P.R.C., NATORI, M. M., LIMA, C. G., VIEGAS, E.M.M. Evaluation of different stunning methods on aspects of animal welfare and meat quality of matrinxã (*Brycon cephalus*). **Italian Journal of Food Sciences**, v. 25, p. 255-262, 2013.
- VIDACEK, S., MEDIC, H., MARUŠIC, N., TONKOVIC, S., PETRAK, T.. Influence of different freezing regimes on bioelectrical properties of Atlantic chub mackerel (*Scomber colias*). **Journal Food Process Engeneering**. v.35, p.735–741, 2012.
- ZAHL, I. H., SAMUELSEN, O., KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.38, n.1, p. 201–218, 2012.
- ZAMPACAVALLLO, G., PARISI, G., MECATTI, M., LUPI, P., GIORGI, G., POLI, B. M. Evaluation of different methods of stunning/killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by tissue stress/quality indicators. **Journal of Food Science and Technology**, 2014.
- ZHU, S., LUO, Y., HONG, H., FENG, L. and SHEN, H. Correlation between electrical conductivity of the gutted fish body and the quality of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) heads stored at 0 and 3°C. **Food Bioprocess Technology**, v.11, p.1–8, 2012.

8. CAPITULO III

TRÊS MÉTODOS DE INSENSIBILIZAÇÃO EM TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO FILÉ CONGELADO.

8.1. RESUMO:

Este estudo avaliou o efeito de diferentes métodos de insensibilização aplicados em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre as alterações químicas, físicas e microbiológicas nos filés armazenados congelados e estocados por 180 dias a -18°C. Três métodos de insensibilização foram avaliados, o choque térmico (água e gelo), a eletronarcose (voltagem de 100V/60s) e anestésico (benzocaína). Características de qualidade da carne foram avaliadas por meio de medidas de pH muscular, perdas de líquidos por cozimento e por descongelamento, capacidade de retenção de água (CRA), oxidação lipídica (TBARS), desnaturação das proteínas (DSC), teor de bases nitrogenadas voláteis (BNV) e nitrogênio não protéico (NNP), textura e cor instrumental, contagens microbiológicas. As amostragens foram realizadas em intervalos de 0, 1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de armazenamento. A capacidade de retenção de água apresentou redução de 22,2% aos 60 dias de estocagem para o choque térmico e para tratamento da eletronarcose foi verificado aumento aos 60 e 180 dias. As perdas por cozimento foram menores nos três tratamentos aos 90 dias de congelamento e apresentaram efeito crescente após 120 dias de estocagem. A textura dos filés apresentou uma redução na força de compressão ao longo do tempo. A contagem de coliformes totais e *Staphylococcus aureus* estavam dentro dos limites permitidos pela legislação durante todo o período de estocagem. Os métodos de insensibilização testados neste estudo mostraram-se eficientes quanto às características físicas e químicas investigadas, preservando a qualidade dos filés e mantendo-os aptos para o consumo até 180 dias de estocagem, mantidos congelados a -18°C.

Palavras-chave: eletronarcose, congelamento, tilápia do Nilo, qualidade da carne.

8.2. ABSTRACT:

This study evaluated the effect of different stunning/killing methods applied in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) on the chemical, physical and microbiological changes in the frozen fillets stored for 180 days at -18 ° C. Three methods of stunning/killing were evaluated, thermal shock (water and ice), electronarcosis (voltage of 100V / 60s) and anesthetic (benzocaine). Fillet quality was assessed by means of muscle pH, loss of liquid for cooking (cooking loss); by thawing (drip loss); water holding capacity (WHC), lipidic oxidation (TBARS); protein denaturation (DSC), volatile substances (VNB), non-protein nitrogen (NPN), instrumental texture and color, and microbiological analysis. Samples were taken at intervals of 0, 1, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days of storage. The water holding capacity was reduced by 22.2% after 60 days of storage for thermal shock, and for treatment of electronarcosis there was an increase from 60 to 180 days. Cooking losses were lower in the three treatments at 90 days of freezing and showed an increasing effect after 120 days of storage. The texture of fillets showed a reduction in compression force over time. The counting of microorganisms investigated on fillet was within the limits allowed by Brazilian law throughout the storage period. The stunning methods tested in this study were effective for physical and chemical characteristics investigated, preserving the quality of the fillets by up to 180 days of storage, kept frozen at -18 ° C.

Keywords: electronarcosis, freezing, Nile tilapia, meat quality.

8.3. INTRODUÇÃO

A produção mundial de peixes provindos da aquicultura alcançou no ano de 2012, em torno de 90,4 milhões de toneladas e é atualmente o setor que mais cresce na produção de alimentos de origem animal, sendo responsável por 49% do consumo de peixe no mundo (FAO, 2014). Para manter esse elevado crescimento é necessário garantir a qualidade do pescado, sendo importante proporcionar condições de manejo adequadas aos animais durante práticas de pré e pós-abate (LOWE et al., 1993). Práticas inadequadas de manejo causam aos peixes condições de estresse que podem afetar de forma severa a qualidade da carne, quando analisadas as variáveis qualitativas de coloração, textura, pH, capacidade de retenção de água, solubilidade e funcionalidade das proteínas (BARBUT, 2002).

Vários métodos de insensibilização e abate vem sendo largamente aplicados na aquicultura em diversas espécies de peixes (MORZEL et al., 2003). Os principais métodos recentemente estudados por diversos pesquisadores são a eletronarcose (Erikson et al., 2012; Lambooij et al., 2010; Lambooij et al., 2012; Sattari et al., 2010;), asfixia em ar ou gelo (Rahmanifarah et al., 2011; Roth et al., 2009; Van de Vis et al., 2003), dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO) (Bjørlykke et al., 2011; Erickson, 2011; Merkin et al., 2014) anestésicos (Erickson, 2011; Panagiotis et al., 2013; Rahmanifarah et al., 2011) e percussão craniana (Lambooij et al., 2007; Lambooij et al., 2010). De acordo com Morzel et al. (2003), os vários procedimentos de insensibilização e abate apresentam diferentes respostas dos peixes à aplicação dos diferentes métodos, portanto, torna-se necessário maiores estudos para conhecer o melhor método a ser aplicado em cada espécie de peixe.

Após o processamento dos peixes, é necessário garantir o frescor, para manter a carne palatável e segura ao consumidor, portanto é necessário aplicar métodos que ajudem a prolongar o estado de frescor bem como a sua vida de prateleira (CAMPUS et al., 2010). Dentre as diversas tecnologias utilizadas para a preservação do pescado, o congelamento é um método amplamente empregado pela indústria, pois permite conservar o músculo pela redução da temperatura abaixo do ponto de congelamento, reduzindo a degradação química e inibindo a

atividade microbiana, assim preservando as características organolépticas da carne por longos períodos de estocagem (CARECHE et al., 1999).

Muitos estudos relatam a aplicação de diferentes métodos de congelamento com a finalidade de reduzir os cristais de gelo e as perdas de qualidade nas carnes, durante o armazenamento congelado (CAI et al., 2014). Em um estudo utilizando diferentes técnicas de congelamento, Zhu et al. (2004) congelaram filés de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) em congelador convencional e de placas, e observaram que as maiores perdas por descongelamento ocorreram nos filés, que foram congelados pelo método convencional.

Kaale et al. (2014) aplicaram o processo de super chilling em filés de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e analisando a superfície e o centro das amostras, verificaram que as perdas de líquido que ocorrem no descongelamento do músculo diminuíram, e a capacidade de retenção de água aumentou com o tempo de armazenamento. Essas mudanças na capacidade de retenção de água são atribuídas à formação, ao crescimento e a distribuição dos cristais de gelo no músculo (BEVILACQUA et al., 1979).

Em um estudo de Herrero et al. (2005) congelando filés de pescada (*Merluccius merluccius L.*) em diferentes temperaturas os autores observaram que a capacidade de retenção de água apresentou reduções nos filés em diferentes tempos de estocagem, onde os filés congelados a -10°C iniciaram as perdas antes de 2 meses de congelamento, enquanto os filés congelados a -30°C iniciaram as perdas após 4 meses de congelamento. Duun e Rustad (2008) relataram que grande parte da água que é perdida pelo descongelamento do músculo contém proteínas miofibrilares.

As perdas que ocorrem no músculo do peixe e afetam a sua qualidade, podem estar associadas com aumento de enzimas e sais que se concentram na água livre do tecido que não forma cristais de gelo e podem ser a causa da desnaturação das proteínas afetando a sua funcionalidade (SHENOUDA, 1980; SMITH, 2011). Durante a aplicação do processo de super chilling, uma pequena quantidade de água no músculo, entre (5 a 30%) é congelada, resultando em maiores quantidades de água livre e menores concentrações de enzimas e sais no tecido. Esse fenômeno poderia ajudar a minimizar a desnaturação proteica (KAALE et al., 2014).

Kiessling et al. (2004), citam a importância de verificar se as perdas de qualidade que ocorrem nos filés são decorrentes da vigorosa contração muscular que ocorre nos peixes no momento do estresse e causa a ruptura dos tecidos ou se são alterações bioquímicas que ocorrem no músculo. Cai et al., (2014), descrevem que as reações de oxidação proteica e lipídica são os principais fatores na perda de qualidade, devido à carne do peixe conter elevados teores de proteína que podem sofrer reações oxidativas ao longo do tempo.

O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes métodos de insensibilização, choque térmico, eletronarcose e o controle com anestésico através dos parâmetros indicadores da qualidade de filés da tilápia do Nilo congelados a -40°C e estocados durante 180 dias a -18°C.

8.4. MATERIAL E MÉTODOS

8.4.1. Peixes

Utilizou-se 126 exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de $600,3 \pm 128,40\text{g}$ e comprimento de $35,25 \pm 2,4\text{ cm}$ adquiridos em uma piscicultura comercial situada na região de Pirassununga, SP. Os peixes foram transportados vivos até o Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Foram alojados em dois tanques de alvenaria com capacidade de 5000L de água cada com renovação constante, mantidos em jejum por 48h antes dos testes.

8.4.2 Métodos de insensibilização

Três métodos de insensibilização foram testados, utilizando-se 42 peixes para cada tratamento:

- a) Eletronarcose: foi realizado dentro de uma caixa plástica com capacidade de 120L água salinizada a 0,03% e condutividade elétrica pré-ajustada em $700\mu\text{S}$. O campo elétrico foi gerado por duas placas de alumínio (65 x 35 cm

de largura) colocadas em duas paredes da caixa, a uma distância de 49 cm, e em cada placa foi acoplado um eletrodo, que estava conectado ao equipamento. Foi aplicada uma tensão elétrica de 100V durante 60s, corrente alternada (AC), frequência de 60Hz e amperagem de 3,2 A.

- b) Choque térmico: uma mistura de água e gelo na proporção de (1:1) totalizando o volume de 80L de solução, realizada numa caixa plástica com capacidade de 120L.
- c) Anestésico: a benzocaína dissolvida em álcool 70% e posteriormente foi misturada numa caixa com capacidade de 120L de água, na proporção de 2g de benzocaína para 10L água.

Após a exposição dos peixes aos diferentes métodos, foi constatada a insensibilização a partir do momento que ocorreu a ausência dos reflexos mediados pelo tronco encefálico, como a rotação dos olhos ao longo do eixo e o movimento opercular (ANIL, 1991). Para complementar o teste de insensibilização, realizou-se a picada, com o auxílio de um alfinete ao longo da linha lateral do peixe, no sentido da cauda para a cabeça. Na sequência foi realizado o abate dos peixes pelo corte dos arcos branquiais, seguido pela sangria. Os parâmetros de qualidade da água foram verificados antes e após cada tratamento com o auxílio da sonda multi-parâmetro Horiba (modelo U-10), para oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade.

8.4.3 Procedimento Experimental

Após a morte, todos os peixes foram medidos com o auxílio de um ictiômetro, pesados em balança digital, filetados e os filés congelados em congelador de placas a -40°C. Cada filé foi embalado em um saco plástico, identificado, e estocado a -18°C por 180 dias.

As amostras foram coletadas logo após a filetagem (0h) para análise microbiológica e calorimetria diferencial de varredura (DSC) e após o congelamento nos intervalos de 1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de estocagem. Para cada tempo amostral foram utilizados aleatoriamente 12 filés de cada tratamento, sendo que nove desses filés foram submetidos ao descongelamento

durante 24h a 4°C em estufa (BOD TE 390, Tecnal) e três filés foram mantidos congelados até o momento das análises de perdas por descongelamento (drip loss).

8.4.4 Análises físico-químicas

8.4.4.1. Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH no músculo foi medido em peagâmetro digital (modelo Hanna HI221), em três filés esquerdos de cada tratamento, sendo homogeneizados em processador de alimentos, retirados 10g de amostra e misturados com 40ml de água destilada.

8.4.4.2. Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV) e Nitrogênio Não Protéico (NNP)

As Bases Nitrogenadas Voláteis foram determinadas de acordo com a metodologia de Howgate (1976) e o Nitrogênio Não Protéico de acordo com Horwitz (1980), realizados em triplicata de três filés esquerdos de cada tratamento. Os valores de BNV e NNP foram expressos em mgN/100g filé. Os resultados foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$BNV = \frac{\text{volume HCL} * \text{Normalidade HCL} * 14 * \text{volume extrato TCA} * 100}{25 * (\text{peso amostra})}$$

$$NNP = \frac{\text{volume HCL} * \text{Normalidade HCL} * 14 * \text{volume extrato TCA} * 100}{20 * (\text{peso amostra}) / \left[(\text{peso amostra}) * \frac{\text{umidade pescado}}{100} \right] + \text{volume extrato TCA}}$$

8.4.4.3. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A análise de oxidação lipídica foi determinada pela metodologia proposta por Vyncke (1970), onde substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram quantificadas em três filés esquerdos de cada tratamento. Foram retirados 5g de amostra, triturada em processador de alimentos e misturados em 25 mL TCA (7,5%). A solução foi filtrada em papel filtro (Whatman nº1) e foram retirados 4 mL do filtrado e misturados a 1mL de TCA (7,5%) e a 5mL de TBA (0,02M), e essa solução foi fervida em banho maria a 100°C durante 40 minutos. Posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro (600 Femto) com comprimento de onda de 538nm. O cálculo dos valores foi realizado de acordo com a equação da reta obtida ($y=193,85x+0,023$) e os resultados foram expressos em mg de malonaldeído/kg amostra.

8.4.4.4. Perda de água por descongelamento, cozimento e capacidade de retenção de água (CRA).

As perdas de água por descongelamento foram determinadas em três filés direitos de cada tratamento. Os filés congelados foram pesados e colocados em funis de vidro cobertos por filme de PVC, durante 48h em ambiente controlado (estufa BOD TE 390, Tecnal) a 4°C. As perdas de água por descongelamento foram expressas em porcentagem de água perdida em relação ao peso original da amostra.

As perdas de água por cocção foram determinadas de acordo com Honikel (1998), em três filés esquerdos de cada tratamento, descongelados em estufa (BOD TE 390, Tecnal) a 4°C durante 24 horas. Após o descongelamento cada filé foi colocado em um saco hermético de polietileno atóxico e submetidos à cocção em banho maria a 90°C por 5 minutos. Após o resfriamento, os filés foram cuidadosamente secos em papel absorvente e pesados em balança analítica (Marte, ASS500C). As perdas de água durante a cocção foram expressas em porcentagem de água perdida em relação ao peso original da amostra.

A capacidade de retenção de água foi realizada em três filés esquerdos descongelados, para cada tratamento em estufa (BOD TE 390, Tecnal) a 4°C durante 24 horas. Foram triturados e 5g de amostra foram colocadas dentro de

dois papéis filtros (Qualy 12,5mm) e centrifugadas a 13.500 rpm durante 10 minutos. A capacidade de retenção de água foi determinada pela porcentagem da diferença do peso da amostra antes e após a centrifugação de acordo com metodologia adaptada de Nakamura e Katoh (1985).

8.4.4.5. Desnaturação protéica (DSC)

A análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi realizada com o auxílio de um calorímetro (DSC TA2010, TA Instruments), em três amostras retiradas da porção dorsal de três filés esquerdos de cada tratamento. As amostras foram pesadas em cápsulas de alumínio, seladas hermeticamente e aquecidas a uma taxa de 10°C/minuto, entre 0 a 120°C em atmosfera inerte (45 mL/minuto de N₂). A temperatura de transição vítrea foi calculada como o ponto de inflexão da linha de base, a temperatura de fusão calculada como o pico endotérmico, e a entalpia de fusão como a área sob a curva do pico de fusão. O cálculo foi realizado de acordo com o programa Universal Analysis V4.2E (TA Instruments) (SOBRAL; HABITANTE, 2001; GONTARD; RING, 1996).

8.4.4.6. Cor e textura instrumental

A cor instrumental foi avaliada na porção dorsal em três filés direitos, realizando-se três leituras ao longo do filé, com um colorímetro HunterLab (Miniscan XE), operando com iluminante D65, ângulo de 10° e célula de medida com abertura de 30 mm. Foram usados os parâmetros de cor, Luminosidade (L*) varia de 0 a 100 (preto a branco); parâmetro a* varia do verde (-) ao vermelho (+); parâmetro b* varia do azul (-) ao amarelo (+) (CIE, 1978).

A textura instrumental foi realizada em três pontos na porção dorsal do filé, realizando três leituras ao longo do filé, com o auxílio de um texturômetro TA.XT icon (Stable Micro Systems, Surrey, U.K.), calibrado com peso padrão de 5kg, utilizando uma probe de alumínio (SMS P/20) com velocidade de 2,0 mm/s e altura da plataforma 20mm. A variável calculada foi à força de compressão (N), utilizando 40% de compressão da altura dos filés. Esse parâmetro foi calculado pelo software do equipamento (Exponent Lite Express, v 4.0,13,0).

8.4.4.7. Análise microbiológica

Foi realizada em três filés esquerdos de cada tratamento, dos quais retirou-se 25g de amostra dos filés e colocou-se em um saco estéril e adicionou-se 225 ml de água peptonada estéril e homogeneizou-se durante 2 minutos no aparelho Stomacher (Lab Blender 400). Na sequência realizaram-se as diluições decimais seriadas em 9 ml de água peptonada. O plaqueamento foi realizado em duplicata nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} utilizando o sistema rápido Compact Dry.

Para investigação de coliformes totais e fecais foram incubadas em meio Compact Dry EC por 24h de 35 a 37°C, quando verificadas colônias azuis (coliformes fecais) e de cor magenta (coliformes totais). Para a investigação de *Staphylococcus aureus*, foram incubadas em meio Compact Dry XSA por 24h de 35 a 37°C, quando foram encontradas colônias típicas de cor azul, realizou-se o teste da coagulase, retirando colônias típicas com o auxílio de uma alça de platina esterilizada e transferiu-se para um tubo com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI). Incubou-se por 24h a 35°C, após 24h transferiu-se 0,2ml da cultura do Caldo BHI para um tubo esterilizado e adicionou-se 0,5ml de Coagu-plasma hidratado, incubou-se a 37°C e observou-se a cada hora se houve a formação de coágulo.

Para a investigação da *Salmonella sp* realizou-se o pré-enriquecimento da amostra, onde a solução de 225 ml de água peptonada com 25g de amostra permaneceram em estufa durante 24h de 35 a 37°C, posteriormente pipetou-se 0,1ml da amostra pré-enriquecida na placa sistema rápido Compact Dry SL e na sequência aplicou-se 1ml de água estéril na mesma placa, incubou-se por 24h a 41 e 43°C, posteriormente realizou-se a contagem.

Os procedimentos e a interpretação dos resultados foram realizados conforme recomendação do Manual Compact DRY®, sendo que para a contagem das colônias típicas investigadas neste estudo foram expressas em Log 10 de Unidades Formadoras de Colônias por grama (Log UFC/g) (AOAC, 2009).

8.4.4.8. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial com três tratamentos e três repetições ao longo do tempo para o DSC (0, 1, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) e (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) para o NNP,

BNV, TBARS, perdas por exsudação, perdas por cozimento, CRA, cor e textura instrumental. Foi realizada análise de variância (ANOVA) com desdobramento de interação entre tratamento x tempo, com nível de significância a 5%. Quando ocorreram diferenças significativas entre as médias dos tempos foi realizado o estudo de regressão como polinômio de até 3° grau. Foi aplicado o teste de TUKEY ao nível de 5% de significância, para comparar as médias dos tratamentos, utilizado o PROC GLIMMIX do SAS University Studio, versão 3.1 basic (2012/2014).

8.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.5.1. Parâmetros de qualidade da água e insensibilização dos peixes

Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados durante a aplicação dos três métodos de insensibilização em tilápias do Nilo e foi possível observar o comportamento dos peixes e verificar o momento exato que ocorreu a insensibilização aparente da maioria dos animais (Tabela 8.1).

Tabela 8.1. Parâmetros de qualidade de água e insensibilização dos peixes.

		Tratamentos		
		Anestésico	Choque térmico	Eletronarcole
T.I. (min)		15	30	1
T (°C)	Início	20,4	1,1	20,8
	Fim	20	1,2	20
OD (mg/L)	Início	7,36	19,9	7,45
	Fim	7,75	19,9	7,70
Cond (mS)	Início	0,015	0,009	0,705
	Fim	0,036	0,024	0,713
pH	Início	5,07	5,84	6,33
	Fim	6,32	5,61	6,00
Salinidade	Início	0,00	0,00	0,03
	Fim	0,00	0,00	0,03

T.I.=tempo de insensibilização aparente, T(°C)= temperatura da água, OD= oxigênio dissolvido, Cond.= condutividade elétrica da água.

A eletronarcose insensibilizou os peixes de forma instantânea, ou seja, a partir do momento que o equipamento foi ligado, formando o campo elétrico, todos os peixes estavam imobilizados e permaneceram nessa condição durante todo o tempo da aplicação da corrente de 100V/60s. Sattari et al. (2010) insensibilizaram clareste (*Heteroclinus* sp) e bagre africano (*Clarias gariepinus*) a uma voltagem de 150V durante 15s e constataram que a inconsciência imediata e o prolongamento da mesma ocorreu após a refrigeração e a decapitação dos peixes.

Erickson et al. (2012) alcançaram a insensibilização instantânea em bacalhau (*Gadus morhua* L) com 107V por 0,5s, entretanto foi necessário uma exposição de 15s para prolongar esse período de inconsciência. Lambooij et al (2007) atordoaram carpas comum (*Cyprinus carpio* L.) com 411V por 5s, observaram que este procedimento é eficaz para a insensibilização dessa espécie.

Acerete et al. (2009) reportaram que a insensibilização de robalo (*D. labrax*) utilizando a narcose por CO₂ ocorreu após 16 min de exposição, enquanto que na asfixia por gelo ocorreu aos 34 min de exposição. Lambooij et al. (2006) expuseram o bagre africano (*C. gariepinus*) em água e gelo durante 30 min e observaram que antes da insensibilização ocorreu taquicardia nos peixes, sendo que, o ritmo cardíaco do bagre africano à temperatura ambiente está em torno de 70 a 80 batimentos/min, e em água gelada, o ritmo aumentou para aproximadamente 300 batimentos/min.

O tratamento controle com a utilização da benzocaína, insensibilizou completamente todos os peixes após 15 min de exposição, entretanto após 5 min foi possível observar que maioria dos peixes já apresentava perda de equilíbrio. Wilkinson et al. (2008) insensibilizando barramundi (*Lates calcarifer*) com iso-eugenol, observaram que a perda de equilíbrio dos peixes, ocorreu em torno de 5 min após a exposição.

Na tabela 8.2 está apresentado o Valor – p de cada variável, obtido na análise de variância ANOVA com nível de significância de 5%.

Tabela 8.2 Valor - p, para cada variável, avaliada entre os tratamentos, ao longo do tempo e na interação de tratamento x tempo.

Variáveis	Valor – p		
	Tratamento	Tempo	Interação (tratamento x tempo)
pH muscular	0,1029	0,1287	0,0146*
BNV	0,2783	0,0001*	0,0241*
NNP	0,0759	0,1469	0,4161
TBARS	0,1632	0,0001*	0,0001*
Cooking	0,0103*	0,0001*	0,1405
Drip loss	0,0659	0,6805	0,9341
CRA	0,9124	0,0001*	0,0094*
Miosina	0,0172*	0,0132*	0,5394
Actina	0,006*	0,2207	0,4655
Textura instrumental	0,7131	0,0001*	0,0418*
Valor de L*	0,7195	0,0001*	0,2576
Valor de a*	0,0488*	0,0018*	0,1788
Valor de b*	0,059	0,1186	0,0016*

* Indica a significância em nível de 5%, na análise de variância (ANOVA).

8.5.2. Medidas de pH

Na Tabela 8.3 estão apresentadas as medidas de pH muscular nos filés dos peixes, estocados sob congelamento durante 180 dias. Foram realizadas análises de regressão para obter as curvas que descreveriam o comportamento, no entanto, nenhum dos modelos da regressão, representou a grande maioria dos dados obtidos, portanto os dados de pH muscular foram expressos na Tabela 8.3.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na interação (tratamento x tempo). Entre os tratamentos e ao longo do tempo de estocagem não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$).

De acordo com Mørkøre et al. (2002), o pH inicial dos filés armazenados congelados, é semelhante ao pH observado nos mesmos filés após o descongelamento, devido à estabilização do pH muscular durante o período de resfriamento e estocagem. De acordo com Mohanty et al. (2010), a qualidade da carne pode ser afetada por enzimas proteolíticas, dentre elas as catepsinas e calpaínas, que possuem ação sinérgica.

Kiessling et al. (2004), encontraram valores de pH 6,15, em filés de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) congelados por 12 meses e pré abatidos com iso-eugenol. Gandotra, et al. (2012), estudando o efeito do congelamento a -12°C

durante 21 dias em músculo de (*Mystus seenghala*), observaram que ocorreu um aumento no valor do pH muscular de 6,8 para 7,1. Morkore et al.(2002), congelando filés de truta arco íris a -20°C durante 3 semanas observaram valores médios de pH nos filés de 6,39. O pH de filés de peixes frescos está próximo a faixa neutra, e pode variar de 6,6 a 6,8 (KILINCCEKER et al., 2009; OEHLenschläGER e SÖRESEN 1997).

Tabela 8.3 Valores médios de pH em filés congelados de tilápia do Nilo submetidos aos tratamentos de choque térmico, eletronarcose e o controle com anestésico.

Tempo (dias) ^(ns)	Tratamentos ^(ns)		
	Choque térmico	Anestésico	Eletronarcose
1	6,8±0,10	6,6±0,10	6,6±0,10
30	6,8±0,63	6,2±0,63	6,4±0,63
60	6,9±0,03	6,6±0,03	6,4±0,03
90	6,7±0,07	6,7±0,07	6,6±0,07
120	6,7±0,25	6,0±0,25	6,7±0,25
150	6,7±0,51	6,4±0,51	6,7±0,51
180	6,5±0,11	6,4±0,11	6,6±0,11

^{ns} indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos e os tratamentos. Média ± erro padrão.

8.5.3. Nitrogênio Não Protéico e Bases Nitrogenadas Voláteis

Os valores médios do Nitrogênio Não Protéico (NNP) observados em filés de tilápia, armazenados congelados não apresentou diferença significativa ao longo do tempo de estocagem e entre os tratamentos ($p>0,05$), observando-se valores médios de 373±6,5mg/100g. Albuquerque et al. (2004), insensibilizando tilápia com CO₂ e hipotermia e estocando os peixes por 12 dias no gelo, não encontraram diferenças significativas ($p>0,05$) para valores de NNP, entre os tratamentos e ao longo do tempo, relatando valores médios de 550 e 520mg/100g, respectivamente. Soccol (2002), não observaram diferenças significativas ($p>0,05$) para o NNP em filés de tilápia do Nilo minimamente processados durante um período de 20 dias de armazenamento em gelo, apresentando valor médio de 568,52mg/100g.

De acordo com Contreras-Gusmán (1994) o NNP é a primeira fração a ser afetada pelo crescimento dos microrganismos, que podem utilizá-la como fonte de

energia ou produzir maior quantidade de NNP através de suas proteases secretadas no músculo.

Para os valores de Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV), foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de estocagem e para a interação tratamento x tempo. Na Figura 8.1A, os tratamentos choque térmico e anestésico apresentaram o mesmo comportamento ao longo do tempo, sendo explicado por uma equação de terceiro grau, obtida pelo estudo de regressão. Os teores de BNV para esses tratamentos apresentaram conteúdos elevados nos primeiros meses de estocagem, apresentando uma redução para os tratamentos choque térmico e anestésico aos 60 e 90 dias e para a eletronarcose aos 120 dias. Em 150 e 180 dias os três tratamentos apresentaram uma tendência de aumentar os valores de BNV.

De acordo com Huss et al (2003) quando o conteúdo de BNV aumenta rapidamente no músculo, o pescado começa a apresentar sinais de perda de qualidade. No tratamento da eletronarcose os teores mais elevados de BNV foram observados aos 30 dias como mostra a Figura 8.1B, sendo possível observar que a curva calculada através da regressão, apresenta uma tendência decrescente ao longo do tempo, podendo ter sido afetado pelo tipo de tratamento empregado.

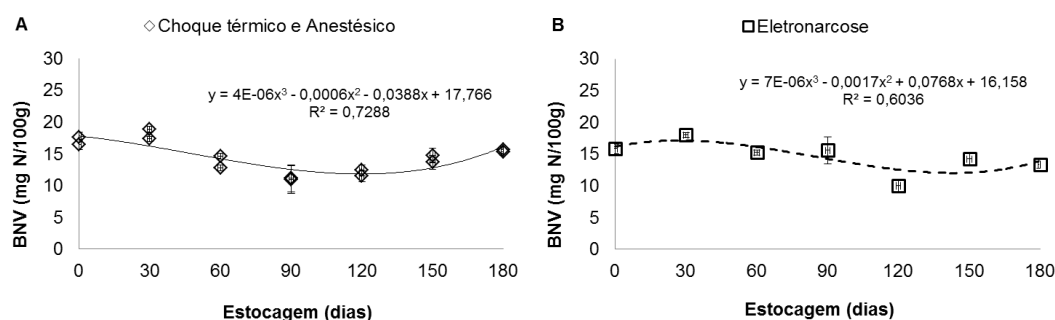


Figura 8.1 Valores médios de Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV) em filés congelados de tilápia do Nilo e estocados a (-18°C), submetidos aos tratamentos de choque térmico e anestésico (A) e eletronarcose (B).

De acordo com Ogawa e Maia (1999) valores de BNV na faixa entre 15 a 25mg N/100g, enquadra-se na categoria de pescado razoavelmente fresco. Os valores de BNV nos filés congelados de tilápia a -18°C por 180 dias investigados

nesse estudo permaneceram dentro dessa faixa e não ultrapassaram os valores máximos exigidos pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), para pescado fresco, resfriado ou congelado, que devem ser inferiores a 30mg N/100g (RIISPOA, 1997).

Huidobro et al. (2001), insensibilizando dourada (*Sparus aurata*) com *ice slurry*, observaram níveis estáveis de BNV, 16 mg N/100g durante 20 dias de armazenamento em gelo. Duran et al. (2008) constataram em trutas (*Oncorhynchus mykiss*) abatidas por percussão craniana e asfixia que não houve variações nos teores de BNV ao longo do tempo. Albuquerque et al. (2004), investigando o músculo de tilápias do Nilo abatidas mediante insensibilização com CO₂ encontraram valores de BNV variando de 18,38 a 21,40 mg N/100g, durante os 17 dias de armazenamento em gelo.

Os valores de BNV podem variar de acordo com a metodologia empregada, a espécie estudada e o estágio de alteração. O pescado de água doce sofre menos alterações que o pescado marinho no seu conteúdo de bases voláteis ao longo do tempo de armazenamento (KUAYE, 1982). Existem algumas controvérsias sobre a efetividade da análise de BNV, como sendo um índice de frescor em peixes. Essa controvérsia surge decorrente das alterações sofridas no músculo do pescado ser quantificadas somente quando surgem os primeiros sinais de deterioração, perceptíveis sensorialmente (LAPA-GUIMARÃES, 2005).

8.5.4. TBARS

O grau de rancidez oxidativa é medido pelo valor do índice de peróxido e o teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), e ocorre particularmente em peixes classificados como gordos (OGAWA e MAIA, 1999). A tilápia do Nilo é considerada um peixe magro, apresentando um teor máximo de 2,5% de gordura corporal e a maior parte do seu tecido é composto por músculo branco, que apresenta menores porcentagens de gordura em relação ao músculo vermelho (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994).

Os valores do TBARS são utilizados como indicador do grau de oxidação lipídica, quantificando o malonaldeído, que é um dos principais produtos formados durante o processo oxidativo (KIRSCHNIK; MACEDO-VIEGAS, 2009).

Os valores de TBARS encontrados neste estudo (Tabela 8.4) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para tempos de estocagem e na interação tratamento x tempo. Um estudo de regressão foi realizado para obtenção de curvas que descreveriam o comportamento dessas variáveis, no entanto nenhum modelo representou a maioria dos dados, portanto os dados foram expressos na forma de tabela. Os tratamentos do choque térmico, eletronarcose e anestésico apresentaram comportamentos semelhantes entre si ao longo do tempo, demonstrando um aumento constante dos valores de TBARS à medida que aumenta o tempo de estocagem dos filés.

A legislação brasileira não determina limite máximo de malonaldeído/kg em produtos cárneos. De acordo com Al-Kahtani et al. (1996) os produtos cárneos podem ser considerados em bom estado, quando os teores de TBARS estão abaixo de 3mg de malonaldeído por kg. O presente estudo apresenta valores que se enquadram dentro do limite estabelecido, estando abaixo de 3mg/kg, citados por Al-Kahtani et al. (1996).

Tabela 8.4 Valores médios de TBARS (mg de malonaldeído/kg amostra) em filés de tilápia do Nilo submetidos aos tratamentos choque térmico e eletronarcose e anestésico

Tempo (dias)	Tratamentos ^(ns)		
	Choque térmico	Anestésico	Eletronarcose
1	0,22±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b	0,24±0,01 ^b
30	0,22±0,01 ^b	0,20±0,01 ^b	0,23±0,01 ^b
60	0,25±0,02 ^{ab}	0,24±0,02 ^b	0,25±0,02 ^b
90	0,24±0,03 ^{ab}	0,22±0,03 ^b	0,36±0,03 ^{ab}
120	0,25±0,01 ^{ab}	0,24±0,01 ^b	0,24±0,01 ^b
150	0,32±0,06 ^{ab}	0,67±0,36 ^b	0,36±0,06 ^{ab}
180	0,33±0,03 ^a	0,22±0,03 ^a	0,39±0,03 ^a

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos. ^{ns} indica que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Média ± erro padrão.

Alguns pesquisadores também observaram aumentos no conteúdo de TBARS ao longo do armazenamento congelado, como refere-se Rostamzad et al. (2011) para filés de “persian sturgeon” (*Acipenser persicus*) nos quais no primeiro dia de armazenamento obtiveram 0,2mg/kg de malonaldeído e no sexto mês esse valor chegou a 2,7mg/kg. Seifzadeh et al. (2012) analisando filés de kılka

(*Clupeonella delicatula*) verificaram que o valor de TBARS no primeiro dia de congelamento chegou a 0,03/mg/kg e ao sexto mês 0,32mg/kg.

8.5.5. Perdas por cozimento (cooking loss), perdas por exsudação (drip loss) e capacidade de retenção de água (CRA)

As perdas de sucos que ocorrem no músculo durante a cocção, dependem do método aplicado, tempo de cozimento e temperatura. As perdas que ocorrem em carnes de boa qualidade são menores que nas carnes de qualidade inferior. Carnes cozidas de forma rápida sofrem menores perdas e mostram-se mais suculentas em relação às cozidas de forma lenta (LAWRIE, 2005).

Neste estudo houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e ao longo do tempo. Os dados expressos na Tabela 8.5 reportam as médias obtidas para as porcentagens das perdas por cocção. Um estudo de regressão foi realizado, no entanto, nenhum dos modelos representou a maioria dos dados obtidos, portanto foram expressos na forma de tabela. O momento da filetagem pode ser de grande influência para garantir maiores ou menores perdas de água no momento do descongelamento, pois o congelamento de filés de peixes brancos filetados no estado de pré-rigor mortis apresentou um aumento nas perdas de água em relação aos peixes filetados em estado de pós-rigor (Sørensen et al., 2004),

Ocorreu redução nas perdas por cozimento até os 90 dias de estocagem e aumento a partir dos 120 dias de armazenamento, fato que pode ter ocorrido em decorrência da atividade proteolítica sofrida pela carne, ou por enzimas produzidas pelos microrganismos, iniciando o estado de degradação do músculo (MOHANTY et al., 2010).

De acordo como Schnee (2000) as perdas por cozimento para frutos do mar congelados estão geralmente em torno de 10 a 30%. Bertram et al. (2006), observaram que a desnaturação de proteínas musculares, interfere no relaxamento e na mobilidade da água da carne, portanto com a desnaturação da miosina em torno de 40°C ocorre uma redução do espaço na rede miofibrilar, expulsando a água e originando as perdas por cozimento.

Tabela 8.5 Valores percentuais (%) das perdas de água por cocção, em filés de tilápia do Nilo

Tempo (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico ^B	Anestésico ^{AB}	Eletronarcore ^A
1	6,8±0,75 ^a	10,9±0,75 ^a	10,7±0,75 ^a
30	9,0±0,75 ^a	9,7±0,75 ^a	9,6±0,75 ^a
60	7,6±0,75 ^a	8,8±0,75 ^a	8,7±0,75 ^a
90	5,6±0,75 ^b	5,5±0,75 ^b	7,3±0,75 ^b
120	9,1±0,75 ^a	7,6±0,75 ^a	10,1±0,75 ^a
150	8,3±0,75 ^a	10,4±0,75 ^a	11,0±0,75 ^a
180	7,5±0,75 ^a	8,5±0,75 ^a	9,5±0,75 ^a

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos. Letras maiúsculas iguais ao lado dos tratamentos indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Média $\pm$ erro padrão.

A capacidade de retenção de água (CRA) está diretamente relacionada com as perdas que ocorrem na redução da suculência da carne durante o cozimento ou armazenamento. Para minimizar as perdas da suculência da carne, o congelamento deve ser executado de forma rápida e o descongelamento de forma lenta (ARAÚJO, 1999).

Os gráficos da regressão obtidos para a capacidade de retenção de água, mostram que ocorreram diferenças significativas ($p<0,05$) para os tempos de estocagem dos filés e na interação tratamento x tempo (Figura 8.2). As menores porcentagens para a capacidade de retenção de água foram observadas aos 60 dias de estocagem, para o tratamento do choque térmico (22,2%) e para a eletronarcore e anestésico no primeiro dia de congelamento 25,86% e 28,8%, respectivamente.

A capacidade de reter ou perder água pode estar relacionada diretamente com os valores de pH da carne, pois valores mais elevados de pH ajudam a preservar a estrutura do tecido (CASTRO, 2007). Neste trabalho o tratamento do choque térmico em que ocorreram as menores perdas de água foi possível verificar que o pH estava na faixa de 6,9, sendo o maior valor registrado ao longo do tempo para esse tratamento.

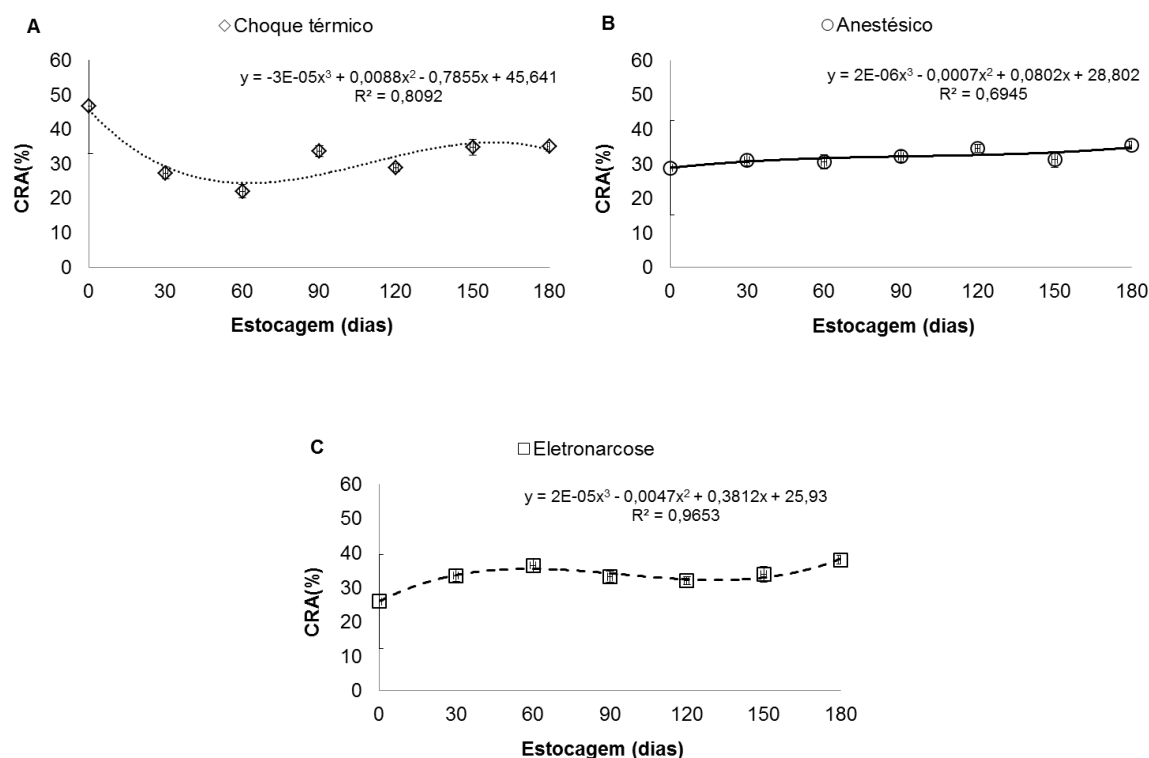


Figura 8.2 Valores percentuais da capacidade de retenção de água (CRA) em filés de tilápia do Nilo submetidas aos tratamentos de choque térmico (A), anestésico (B) e eletronarcose (C).

O tratamento da eletronarcose que apresentou as maiores perdas de água apresentam o seu valor pH=6,6. Mørkøre et al. (2002), também relataram uma relação positiva entre a capacidade de retenção de água com o pH muscular em filés de truta arco-íris após o congelamento.

As perdas que ocorrem no músculo por exsudação (*drip loss*) não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo de estocagem e para os tratamentos ($p>0,05$), apresentando valores médios de $1,79\pm0,1\%$. Estes valores baixos observados podem ser consequências do congelamento rápido a -40°C que foi aplicado aos filés de tilápia.

Filés de salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) armazenados a 0°C por 22 dias tiveram aumento nas perdas de água com o passar do tempo de estocagem, atingindo valor médio de 2,9% de perdas ao término do experimento (FLETCHER et al., 2003). De acordo com Rosenvold et al. (2008), as perdas de água que ocorrem na carne estão relacionadas com as proteínas do citoesqueleto, ou ocorrem devido à degradação das proteínas, ao longo do tempo de estocagem.

Bertram et al. (2006), sugerem que para melhorar as taxas de capacidade de retenção de água e a redução das perdas por descongelamento, deve-se levar em consideração as taxas de refrigeração, que podem afetar a dinâmica da água no músculo. Durante o congelamento executado com o abaixamento rápido da temperatura, ocorre a formação de pequenos cristais de gelo dentro e fora da célula, e esse congelamento rápido impede que os fluidos intracelulares saiam para o espaço intercelular, o que diminui as perdas de água no momento do descongelamento, conservando as propriedades sensoriais do músculo.

8.5.6. Desnaturação proteica (DSC)

O estudo de desnaturação da actina e miosina no músculo dos peixes tornam-se relevante, por compreender os principais componentes da proteína miofibrilar, e são responsáveis por influenciar as características da carne como a textura e a capacidade de retenção de água (TONBERG et al., 2005).

Amostras do músculo fresco foram submetidas a análise de DSC, como parâmetro comparativo com as amostras congeladas ao longo do tempo de estocagem. A temperatura de desnaturação da actina no músculo fresco e no congelado apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, no qual o tratamento choque térmico apresentou valor médio de temperatura de desnaturação de $73,3 \pm 0,14^\circ\text{C}$, o anestésico $74,31 \pm 0,14^\circ\text{C}$ e a eletronarcose $74,10 \pm 0,14^\circ\text{C}$. Monterrey-Quintero e Sobral (2000), investigando temperaturas de desnaturação no músculo fresco de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), encontraram valores de $75,9^\circ\text{C}$ para a actina. Matos et al. (2011), encontraram valores para a actina em filés congelados de dourada (*Sparus aurata*) variando entre $73,94^\circ\text{C}$ a $74,95^\circ\text{C}$. Santos (2013), analisando filés de tilápia do Nilo congelados a -40°C e mantidos a -18°C verificou picos de actina a $75,31^\circ\text{C}$ em filés submetidos ao abate por choque térmico e $74,82^\circ\text{C}$ em peixes submetidos à eletronarcose.

Foi realizado o estudo de regressão para a temperatura de desnaturação da miosina, no entanto, nenhum dos modelos aplicados representou a maioria dos dados obtidos, motivo pelo qual esses resultados estão apresentados na Tabela 8.6. Para a miosina foi possível observar que houve diferença significativa

($p < 0,05$) entre os tratamentos e os tempos de estocagem, sendo que a amostra de músculo fresco apresentou maior temperatura de desnaturação, para o choque térmico ($54,2^{\circ}\text{C}$), anestésico ($54,6^{\circ}\text{C}$) e eletronarcose ($54,6^{\circ}\text{C}$), quando comparado com os filés congelados em 180 dias em que foram registradas as menores temperaturas de desnaturação, $53,8^{\circ}\text{C}$, $53,2^{\circ}\text{C}$ e $53,4^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Monterrey-Quintero e Sobral (2000), avaliando temperatura de desnaturação da miosina para filés frescos de tilápia do Nilo, encontraram valores de $54,4^{\circ}\text{C}$, valores muito semelhantes aos encontrados no presente estudo. Matos et al. (2011) verificando a desnaturação da miosina em filés de dourada (*Sparus aurata*) observaram que o pico de desnaturação ocorreu a $49,44^{\circ}\text{C}$ para filés fresco e a $49,11^{\circ}\text{C}$ para o filé congelado.

Santos (2013) estudando a desnaturação em filés congelados de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) observou que os picos de actina foram mais elevados no primeiro dia de congelamento para a eletronarcose $74,71^{\circ}\text{C}$ e choque térmico $74,96^{\circ}\text{C}$, quando comparados com a temperatura de desnaturação investigada aos 180 dias de congelamento, $74,35$ e $74,48^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

Tabela 8.6 Valores médios da temperatura de desnaturação da miosina em filés frescos e congelados de tilápia do Nilo a -18°C .

Tempo (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico ^A	Anestésico ^B	Eletronarcose ^B
0	$54,2 \pm 0,35^a$	$54,6 \pm 0,35^a$	$54,6 \pm 0,35^a$
1	$54,2 \pm 0,35^{ab}$	$53,9 \pm 0,35^{ab}$	$53,4 \pm 0,35^{ab}$
30	$54,6 \pm 0,35^{ab}$	$53,5 \pm 0,35^{ab}$	$53,8 \pm 0,35^{ab}$
60	$54,7 \pm 0,35^{ab}$	$53,4 \pm 0,35^{ab}$	$53,4 \pm 0,35^{ab}$
90	$53,9 \pm 0,35^b$	$53,4 \pm 0,35^{ab}$	$53,1 \pm 0,35^{ab}$
120	$53,9 \pm 0,35^{ab}$	$53,7 \pm 0,35^{ab}$	$53,1 \pm 0,35^{ab}$
150	$54,8 \pm 0,35^{ab}$	$53,9 \pm 0,35^{ab}$	$53,6 \pm 0,35^{ab}$
180	$53,8 \pm 0,35^b$	$53,2 \pm 0,35^b$	$53,4 \pm 0,35^b$

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos. Letras maiúsculas iguais ao lado dos tratamentos indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Média $\pm$ erro padrão

A temperatura de desnaturação da miosina foi mais elevada no primeiro dia de congelamento para a eletronarcose ($53,76^{\circ}\text{C}$) e choque térmico ($53,89^{\circ}\text{C}$) e menor quando investigada aos 180 dias de congelamento $52,16$ e $52,82^{\circ}\text{C}$ respectivamente. O efeito do congelamento dos filés ao longo do tempo pode ter

causado a destruição de certas interações entre as miofibrilas, tornando as proteínas mais instáveis termicamente.

8.5.7. Textura Instrumental

A medida da textura tem sido utilizada em numerosos estudos com o objetivo de avaliar as mudanças estruturais do músculo no decorrer do armazenamento. A firmeza do músculo é um importante índice de frescor; quando ocorre o amolecimento da carne, é um sinal de que o músculo está sofrendo algum processo de deterioração, com perdas da qualidade da carne (SUÁREZ-MAHECHA et al., 2007).

Os valores para textura dos filés de tilápia obtidos neste estudo (Figura 8.3) mostraram que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento e na interação tratamento x tempo. Na regressão observa-se que os tratamentos choque térmico e anestésico foram expressos pela mesma curva, demonstrando que ambos apresentaram um comportamento semelhante. A maior força de compressão aplicada nos filés do choque térmico, anestésico e eletronarcose ao longo do tempo foi observada aos 60 dias de congelamento, 40,31, 42,66 e 49,61N e após os 180 dias de congelamento houve uma redução da força de compressão, 15,50, 19,95 e 22,9N, respectivamente.

Esse aumento na força de compressão, está relacionado com o endurecimento aparente do filé, que pode ter ocorrido em função da desidratação causada pelo congelamento ou pode estar associado com o aumento do pH no músculo. Love et al. (1972), relataram que a aplicação de maiores forças mecânicas no filé está relacionada a pequenos aumentos no valor de pH muscular nos primeiros meses de congelamento.

A mudança na textura da carne após o armazenamento congelado é explicada pela redução da solubilidade e desnaturação de proteínas musculares (SIKORSKI et al., 1994).

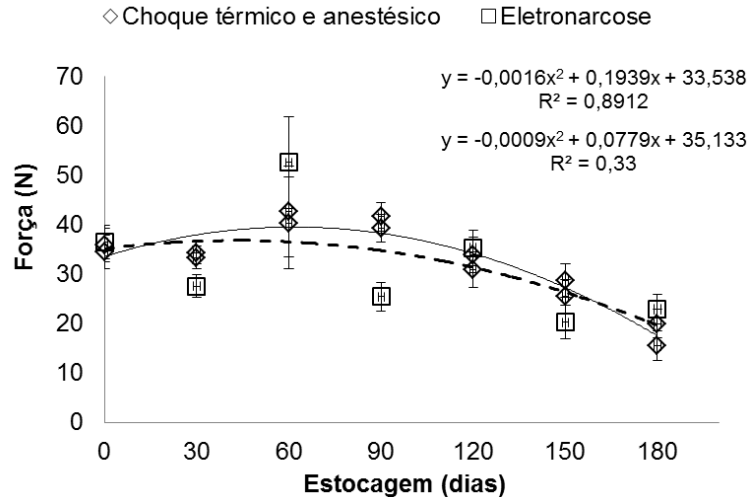


Figura 8.3 Teste de compressão dos filés de tilápia do Nilo armazenados congelados a -18°C , durante 180 dias.

Em um estudo realizado por Suárez-Mahecha et al. (2007), com matrinxã (*Brycon cephalus*) ocorreu uma redução na força de ruptura do filé ao longo do tempo de armazenamento, que pode ter ocorrido devido a desintegração das fibras de colágeno no tecido conectivo, sendo conhecido como amolecimento do músculo pós-morte.

8.5.8. Cor instrumental

Para os parâmetros de cor instrumental (L^* , a^* , b^*) foram realizadas análises de regressão, no entanto, nenhum dos modelos aplicados representou a grande maioria dos dados obtidos, motivo pelo qual esses resultados estão apresentados na forma de tabela.

Para as variáveis a^* (-) verde e (+) vermelho, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos e os tratamentos, como mostra a Tabela 8.7. No tratamento do choque térmico foi possível observar um crescimento mais acentuado ao longo do tempo, em relação ao tratamento anestésico, que apresentou uma redução na intensidade da coloração vermelha dos filés. Enquanto que no tratamento da eletronarcose ocorreram as maiores intensidades da cor vermelha nos filés ao longo do tempo.

Ramos et al. (2005), atordoando rã touro (*Rana catesbeiana*) por eletronarcose, obtiveram valores de a^* (1,94), valores muito semelhantes aos encontrados nesse estudo para a eletronarcose. As menores intensidades da coloração vermelha no filé da tilápia foram observadas aos 120 dias para o tratamento choque térmico (-2,3) e anestésico (-2,0).

Tabela 8.7 Valores médios da cor a^* em filés congelados de tilápia do Nilo e armazenados estocados a -18°C

Tempo (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico ^A	Anestésico ^A	Eletronarcose ^A
1	$-1,6 \pm 0,5^{ab}$	$-0,7 \pm 0,5^{ab}$	$-1,3 \pm 0,5^{ab}$
30	$-0,7 \pm 0,5^{ab}$	$-0,5 \pm 0,5^{ab}$	$-1,1 \pm 0,5^{ab}$
60	$-1,7 \pm 0,5^b$	$-1,8 \pm 0,5^b$	$-1,0 \pm 0,5^b$
90	$-0,5 \pm 0,5^a$	$0,1 \pm 0,5^a$	$0,1 \pm 0,5^a$
120	$-2,3 \pm 0,5^b$	$-2,0 \pm 0,5^b$	$-0,5 \pm 0,5^b$
150	$-0,8 \pm 0,5^a$	$-0,7 \pm 0,5^a$	$-1,5 \pm 0,5^a$
180	$-0,8 \pm 0,5^{ab}$	$-1,8 \pm 0,5^{ab}$	$-0,4 \pm 0,5^{ab}$

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos. Letras maiúsculas iguais ao lado dos tratamentos indicam que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Média $\pm$ erro padrão

A cor instrumental medida nos filés de tilápia ao longo do tempo foi expressa de acordo com os padrões da CIELab, onde a intensidade dos valores b^* (-) azul e (+) amarelo apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para a interação tratamento x tempo, como mostra a Tabela 8.8. O valor b^* apresentou aos 30 e 180 dias para o tratamento do choque térmico e aos 30 e 90 dias para o anestésico e para a eletronarcose aos 120 e 150 dias, um aumento da coloração amarela nos filés. Este comportamento apesar de apresentar oscilações ao longo do tempo não causou qualquer efeito na qualidade da carne estocada congelada.

A intensidade L^* , que varia de (preto-branco) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo de estocagem (Tabela 8.9). No presente estudo com tilápia do Nilo as maiores luminosidades foram observadas aos 60 dias de congelamento, para os três tratamentos, choque térmico, eletronarcose e o anestésico de 58,2; 58,5 e 59,8, respectivamente. Ramos et al. (2005),

atordoando rã touro (*Rana catesbeiana*) utilizando choque térmico e eletronarcose obtiveram valores de luminosidade 57,84 e 57,99.

Tabela 8.8 Valores médios da cor b* em filés de tilápia do Nilo em filés congelados e armazenados estocados a -18°C.

Tempo (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico	Anestésico	Eletronarcose
1	8,1±0,66 ^{Aa}	8,4±0,66 ^{Aa}	7,7±0,66 ^{Ab}
30	9,7±0,66 ^{Aa}	9,4±0,66 ^{Aa}	8,8±0,66 ^{Ab}
60	8,4±0,66 ^{Aa}	8,4±0,66 ^{Aa}	8,3±0,66 ^{Ab}
90	9,0±0,66 ^{Aa}	9,9±0,66 ^{Aa}	9,6±0,66 ^{Aab}
120	7,6±0,66 ^{Ba}	9,4±0,66 ^{ABa}	10,3±0,66 ^{Aab}
150	7,2±0,66 ^{Ba}	8,1±0,66 ^{Ba}	12,3±0,66 ^{Aa}
180	9,6±0,66 ^{Aa}	7,5±0,66 ^{Aa}	9,6±0,66 ^{Aab}

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos. Média $\pm$ erro padrão

Lambooij, et al. (2008) observaram que variações nos padrões de cor (L^* , a^* , b^*) em robalos (*Dicentrarchus labrax*) foram significativamente dependentes do método de atordoamento/abate e do tempo de armazenamento.

Tabela 8.9 Valores médios da luminosidade L^* em filés congelados de tilápia do Nilo e armazenados estocados a -18°C.

Tempo (dias)	Tratamentos ^(ns)		
	Choque térmico	Anestésico	Eletronarcose
1	54,6±1,28 ^{bc}	53,8±1,28 ^{bc}	54,2±1,28 ^{bc}
30	54,9±1,28 ^{bc}	52,7±1,28 ^{bc}	54,1±1,28 ^{bc}
60	58,2±1,28 ^a	59,1±1,28 ^a	58,5±1,28 ^a
90	54,4±1,28 ^b	54,2±1,28 ^b	50,0±1,28 ^b
120	54,7±1,28 ^{ab}	57,8±1,28 ^{ab}	56,7±1,28 ^{ab}
150	49,7±1,28 ^c	50,1±1,28 ^c	49,2±1,28 ^c
180	54,3±1,28 ^{bc}	53,9±1,28 ^{bc}	52,9±1,28 ^{bc}

Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos. ^{ns} indica que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Média $\pm$ erro padrão.

Digre et al. (2010) verificaram em bacalhau (*Gadus morhua*) que o estresse moderado antes do atordoamento elétrico, causou diferenças significativas no

valor de a^* (maior intensidade de vermelho) e menores para o valor b^* (menor intensidade de amarelo nos filés).

8.5.9. Análise microbiológica

De acordo com as normas e padrões para alimentos, estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para o pescado in natura, refrigerado, ou congelado, devem ser observados os seguintes padrões microbiológicos: *Salmonella sp.*, ausência em 25g e *Estafilococos Coagulase Positiva* máximo de 10^3 UFC/g e coliformes fecais, no máximo 10^2 UFC/g (ANVISA, 2001).

Não foi detectada a presença de *E. coli* em nenhuma das amostras durante o período de armazenamento. Isso provavelmente ocorreu em virtude das tilápias terem passado por um período de depuração de 48h que permitiu a limpeza do trato gastrointestinal evitando desse modo à contaminação durante o abate e a filetagem.

Salmonella sp foi ausente em todos os períodos e em todas as amostras. Esse resultado era esperado, e está de acordo com a exigência da legislação vigente. A *Salmonella* é um microrganismo patogênico e seu habitat é o trato gastrointestinal de humanos e animais. A mesma não faz parte da microbiota natural do pescado, sua presença é oriunda principalmente do manuseio ou do contato com superfícies higienizadas de forma inadequada (LEITÃO, 1997).

Tabela 8.10 Contagem de coliformes totais (Log 10 UFC/g) em filés de tilápia mantidos sob congelamento (-18°C), durante 180 dias.

Estocagem (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico	Anestésico	Eletronarcose
0	2,0	1,3	2,3
30	1,8	1,0	1,8
60	1,8	2,0	1,7
90	1,9	2,2	1,3
120	1,6	1,3	1,0
150	2,0	2,0	1,8
180	2,0	2,0	1,0

Os coliformes totais investigados no músculo do pescado, sendo apresentados na Tabela 8.10. Todos os valores de coliformes totais encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, apresentando redução de colônias ao longo do tempo de estocagem.

Na Tabela 8.11 estão os resultados da contagem de *Staphylococcus aureus* em filés de tilápia. Observando a tabela, verifica-se que nenhum dos tratamentos apresentou valores acima dos limites estabelecidos pela legislação.

Tabela 8.11 *Staphylococcus aureus* (Log 10 UFC/g) em filés de tilápia mantidos sob congelamento (-18°C), durante 180 dias.

Estocagem (dias)	Tratamentos		
	Choque térmico	Anestésico	Eletronarcose
0	2,0	2,0	1,7
30	2,0	2,0	2,0
60	2,0	2,0	2,0
90	1,5	2,0	2,0
120	2,0	2,0	2,0
150	1,3	2,0	2,0
180	1,3	2,0	2,0

As colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, investigadas em filés de tilápia do Nilo estão dentro do limite exigido pela legislação vigente, indicando que os peixes foram manuseados de forma correta, logo após a captura, e durante as etapas de processamento foram adotadas medidas eficazes de higiene.

8.6. CONCLUSÕES

Os peixes submetidos a diferentes métodos de insensibilização, choque térmico, anestésico e eletronarcose e seus filés armazenados congelados a (-18°C), foram avaliados de acordo com a maioria das características físicas e químicas, e apresentaram-se aptos para o consumo até os 180 dias de estocagem.

Boas práticas de higiene foram aplicadas nas etapas de processamento e manipulação do pescado. Alguns microrganismos como a *Salmonella sp*, *E. coli*

permaneceram ausentes e *Staphylococcus aureus* e Coliformes totais mantiveram-se abaixo do limites permitidos pela legislação.

A coloração dos filés no tratamento da eletronarcose apresentou maior intensidade vermelha, causada pela hemorragia durante a aplicação do choque elétrico.

Os três métodos de insensibilização testados em tilápia do Nilo foram bem executados e garantiram a qualidade dos filés estocados até 180 dias de congelamento.

8.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de insensibilização testado nesse estudo para a tilápia do Nilo, a eletronarcose, garantiu condições de bem-estar aos peixes, garantindo de forma instantânea a sua insensibilização e ausência de qualquer tipo de dor ou sofrimento no momento do abate.

A eletronarcose foi testada em escala laboratorial, com um número pequeno de animais e condições elétricas e de qualidade da água controladas, sendo, portanto necessário realizar um estudo sobre a sua aplicabilidade em escala comercial, onde serão abatidos grandes lotes de peixes diariamente.

8.8. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa (CNPq nº475374/2012-6).

À CAPES pela bolsa concedida a aluna de doutorado.

8.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERETE, L., REIG, L., ALVAREZ, D., FLOS, R., E TORT, L. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, v.287(1-2), p.139–144, 2009.

- ALBUQUERQUE, W., ZAPATA, J., ALMEIDA, R. Estado de frescor, textura e composição muscular da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) abatida com dióxido de carbono e armazenada em gelo. **Revista Ciência Agronômica**, v.35, p.264–271, 2004.
- AL-KAHTANI, H.A., ABU-TARBOUSH, H.M., BAJABER, A.S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in tilapia and Spanish mackerel. **Journal of Food Science**, v.61, n.4, p.729-733, 1996.
- ANIL, M. H. Studies on the return of physical reflexes in pigs following electrical stunning. **Meat Science**, v.30, n.1, p.13–21, 1991.
- AOAC - Research Institute. Certificate of performance tested SM status. **Certificado nº 100401** - Nissui Compact Dry Yeast and Mould. Washington, 2009.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos – Teoria e Prática**. Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2ª ed, 1999.
- BARBUT, S., Meat color and flavour. In: **Poultry products processing: an industry guide**. Boca raton: CRC, press, cap 13, 2002, 447-453p.
- BEVILACQUA, A., N. E. ZARITZKY, A. CAVELO. Histological measurements of ice in frozen beef. **Journal of Food and Technology**, v.14, p.237-251, 1979.
- BERTRAM, H. C., KOHLER, A., BOCKER, U., OFSTAD, R., ANDERSEN, H. J. Heat-induced changes in myofibrillar protein structures and myowater of two pork qualities. A combined FT-IR spectroscopy and low-field NMR relaxometry study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.5, p.1740–1746, 2006.
- BJØRLYKKE, G. A., ROTH, B., SØRHEIM, O., KVAMME, B. O., SLINDE, E. The effects of carbon monoxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) **Food Chemistry**, v.127, n.4, p.1706–1711, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **RIISPOA - Portaria 185**, 1997. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 21 de agosto de 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2001. **Resolução RDC n. 12**, de 02 de janeiro de 2001 – Diário Oficial da União 10 de janeiro de 2001, seção 1.
- CAI, L., WU, X., LI, X., ZHONG, K., LI, Y., LI, J. Effects of different freezing treatments on physicochemical responses and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.59, n.1, p.122–129, 2014.
- CAMPUS, M., ADDIS, M.F., CAPPUCCINELLI, 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*) following high-pressure treatment. **Journal Food Engineering**, v.96, n.2, p.192–8, 2010.
- CARECHE, M., HERRERO, A.M., RODRIGUEZ-CASADO, A., DEL MAZO, M.L., CARMONA, P., Structural changes of hake (*Merluccius merluccius* L.) fillets: effects of freezing and frozen storage. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.47, p.952–959, 1999.
- CASTRO, D. A. **Perdas de água em filé de pescado do pantanal**. 2007, 50p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campo Grande, 2007.
- CIE - Commission Internationale de l'éclairage. **Recommendations on uniform colourspace–colour equations, psychometric colour terms**. Paris, n.2 to CIE Publ. n.15 (E-1.3.L) 1971/9TC-1- 3,1978.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.
- DIGRE, H., ERIKSON, U., MISIMI, E., LAMBOOIJ, B., VAN DE VIS, H. Electrical stunning of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): A comparison of an industrial and experimental method. **Aquaculture Research** v.41, p.1190–1202, 2010.
- DURAN, A., ERDEMLI, U., KARAKAYA, M., YILMAZ, M.T. Effects of slaughter methods on physical, biochemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) in pre, in or post-rigor periods. **Fish Science**, v.74, p.1146-1156, 2008.
- DUUN, A. S., RUSTAD, T. Quality of super chilled vacuum packed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at -1.4 and -3.6° C. **Food Chemistry**, v.106, p.122–131, 2008.
- ERIKSON, U. Assessment of different stunning methods and recovery of farmed Atlantic salmon: iso-eugenol, nitrogen, and three levels of carbon dioxide. **Animal Welfare**, v.20, p.365–375, 2011.
- ERIKSON, U., LAMBOOIJ, B., DIGRE, H., REIMERT, H. G. M., BONDØ, M., VAN DER VIS, H. Conditions for instant electrical stunning of farmed Atlantic cod after de watering, maintenance of unconsciousness, effects of stress, and fillet quality — A comparison with AQUI-S™. **Aquaculture**, v.324-325, p.135–144, 2012.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, p.243, 2012-2014. Disponível em: <http://www.fao.org> Acesso em 14 de julho de 2014.
- FLETCHER, G.C., CORRIGAN, V.K., SUMMERS, G. LEONARD, M.G., JERRETT, A.R., BLACK. S. E. Spoilage of Rusted Harvested King Salmon

- (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Food Science**, v.68, n.9, p. 2810-2816, 2003.
- GANDOTRA R, SHARMA S, KOUL M, GUPTA S. Effect of chilling and freezing on fish muscle. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.2, n.5, p. 5-9, 2012.
- GONTARD, N., RING, S. Edible Wheat Gluten Film: Influence of Water Content on Glass. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, p.3474–3478, 1996.
- HERRERO, A. M., CARMONA, P., GARCÍA, M. L., SOLAS, M. T., CARECHE, M. Ultrastructural changes and structure and mobility of myofibrils in frozen-stored hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle: relationship with functionality and texture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.2558-2566, 2005.
- HONIKEL, K.O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science**, p.447, 1998.
- HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Washington : 13th ed, D.C. AOAC, 1980.
- HOWGATE, P. **Determination of total Volatile Bases**. Torry Research Station, Aberdeen, 1976.
- HUIDOBRO, A., MENDES, R., NUNES, M. L. Slaughtering of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in liquid ice: influence on fish quality. **European Food Research Technology**, v.213, p.267-272, 2001.
- HUSS, H.H., ABABOUC, L., GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. **Fisheries Technical Papers**, n. 444, p.203. 230, 2003.
- ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS Sampling plans for fish and shellfish. In: **Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications**, Toronto: 2nd ed. University of Toronto Press, v.2, 1986, 181–196p.
- KAALE, L. D., EIKEVIK, T. M., RUSTAD, T., E NORDTVEDT, T. S. Changes in water holding capacity and drip loss of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle during superchilled storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.55, n.2, 528–535, 2014.
- KIESSLING, A., ESPE, M., RUOHONEN, K., E MØRKØRE, T. Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO₂ anesthesia. **Aquaculture**, v. 236(1-4), p.645–657, 2004.

- KILINCCEKER, O., DOGAN, I.S., KUCUKONER, E. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. **LWT - Food Science and Technology**. v.42, p.868-873, 2009.
- KIRSCHNIK, P. G., MACEDO-VIEGAS, E.M.M. Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a -18°C . **Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v.29, n.1, p.200-206, 2009.
- KUAYE, A.Y. **Comparação dos métodos para determinação das bases nitrogenadas em pescado: parâmetros críticos e modificações**. 1982. 95f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.
- LAMBOOIJ, E., KLOOSTERBOER, R. J., GERRITZEN, M. A., VAN DE VIS, J. W. Assessment of electrical stunning in fresh water of african catfish (*Clarias gariepinus*) and chilling in ice water for loss of consciousness and sensibility. **Aquaculture**, v. 25(1-4), p.388–395, 2006.
- LAMBOOIJ, E., PILARCZYK, M., BIALOWAS, H., VAN DEN BOOGAART, J. G. M., VAN DE VIS, J. W. Electrical and percussive stunning of the common carp (*Cyprinus carpio* L.): Neurological and behavioural assessment. **Aquacultural Engineering**, v.37, n.2, p.171–179, 2007.
- LAMBOOIJ, B., GERRITZEN, M.A., REIMERT, H., BURGGRAAF, D., ANDRÉ, G., VAN DE VIS, H. Evaluation of electrical stunning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in seawater and killing by chilling: welfare aspects, product quality and possibilities for implementation. **Aquaculture Research**, v.39, p.50–58, 2008.
- LAMBOOIJ E., GRIMBØ E., VAN DE VIS J.W., REIMERT H., NORTVEDT R. ROTH, B. Percussion and electrical stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar*) after dewatering and subsequent effect on brain and heart activities. **Aquaculture**, v.300, p.107–112, 2010.
- LAMBOOIJ, E., DIGRE, H., REIMERT, H. G. M., AURSAND, I. G., GRIMSMO, L., VAN DE VIS, J. W. Effects of on-board storage and electrical stunning of wild cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) on brain and heart activity. **Fisheries Research**, v.127-128, p.1–8, 2012.
- LAPA-GUIMARÃES, J. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado**. 2005. 125 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. Porto Alegre: 6ª ed. Artmed, 2005, 384p.
- LEITÃO, M.F.F., RIOS, D.P.F.A., GUIMARÃES, J.G.L., BALDINI, V.L.S., MAINARDES, C.S.R.P. Alterações químicas e microbiológicas em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração a 5°C . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.160-166, 1997.

- LOWE, T., RYDER, J.M., CARRAGER, J.F., WELLS, R.M.G. Flesh quality in snapper, (*Pagrus auratus*), affected by capture stress. **Journal Food Science** v.58. p.770–796, 1993.
- LOVE, R.M., LAVETY, J., GARCIA, N.G. The connective tissues of fish. VI. Mechanical studies on isolated myocommata. **Journal Food Technology**, v.7. p. 291-301, 1972.
- MATOS, E., SILVA, T. S., TIAGO, T., AURELIANO, M., DINIS, M. T., DIAS, J. Effect of harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*): A differential scanning calorimetry study. **Food Chemistry**, v.126, n.1, p.270–276, 2011.
- MERKIN, G. V., STIEN, L. H., PITTMAN, K., NORTVEDT, R. The effect of stunning methods and season on muscle texture hardness in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Food Science**, v.79, n.6, p.1137–1141, 2014.
- MOHANTY, T.R. Molecular and biological factors affecting skeletal muscle cells after slaughtering and their impact on meat quality: a mini-review. **Journal of Muscle Foods**, v.21, p.51-78, 2010.
- MONTERREY-QUINTERO, E.S., SOBRAL, P.J. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo para elaboração de biofilmes **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.179-189, 2000.
- MORKORE, T., HANSEN, A.A., UNANDER, E., EINEN, O. Composition, liquid leakage, and mechanical properties of farmed rainbow trout: variation between fillet sections and the impact of ice and frozen storage. **Journal Food Science**, v.67, p.1933–1938, 2002.
- MORZEL, M., SOHIER, D., VAN DE VIS, H. Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.83, n.1, p.19–28, 2003.
- NAKAMURA, M. KATOH, K. Influence of thawing method on several properties of rabbit meat. **Bulletin of Ishikawa Prefecture College of Agriculture Ishikawa**. v 11, n.1, p.45-49, 1985.
- OEHLENSCHLÄGER J., SÖRENSEN, N.K. Criteria of fish freshness and quality aspects. In: THE FINAL MEETING OF THE CONCERTED ACTION - EVALUATION OF FISH FRESHNESS - 1997, Nantes. **Anais...** Nantes, 1997. p.30-35.
- OGAWA. M; MAIA E.L. **Manual de Pesca: Ciência de Tecnologia do Pescado**. São Paulo : Livraria Varela, 1999, 429p
- PANAGIOTIS, E.S., TSOPELAKOS, A., CHARISMIADOU, M. A., BATZINA, A., DELIGEORGIS, S.G., MILIOU, H. Comparison of the effects of six stunning/ killing procedures on flesh quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) and evaluation of clove oil anaesthesia followed by chilling on ice/water

- slurry for potential implementation in aquaculture. **Aquaculture Research** p.1–12, 2013.
- RAHMANIFARAH, K., SHABANPOUR, B., SATTARI, A. Effects of clove oil on behavior and flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in comparison with pre-slaughter CO₂ stunning, chilling and asphyxia. **Turkish Journal of Fisheries Aquatic Sciences**, v.11, p.139–147, 2011.
- RAMOS, E. M., GOMIDE, L. A. M., FONTES, P. R., RAMOS, A. L. S. PETERNELLI, L. A. Meat color evaluation and pigment levels in bullfrog (*Rana catesbeiana*) slaughtered by different methods. **Aquaculture**, v. 245(1-4), p.175–182, 2005.
- ROSENVOLD, K., NORTH, M., DEVINE, C. E., MICKLANDER, E., HANSEN, P. W., DOBBIE, P. M. The protective effect of electrical stimulation and wrapping on beef tenderness at high pre rigor temperatures. **Meat Science**, v.79, n.2, p.299–306, 2008.
- ROSTAMZAD H, SHABANPOUR B, SHABANI A, SHAHIRI H. Enhancement of the storage quality of frozen Persian sturgeon fillets by using of ascorbic acid. **International Food Research Journal**, v.18, p.109-116, 2011.
- ROTH, B., IMSLAND, A.K., FOSS, A. Live chilling of turbot and subsequent effect on behaviour, muscle stiffness, muscle quality, blood gases and chemistry. **Animal Welfare**, v.18, p.33–41, 2009.
- SANTOS, E.C. **Métodos de abate e qualidade da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2013. 97f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, 2013.
- SATTARI, A., LAMBOOIJ, E., SHARIFI, H., ABBINK, W., REIMERT, H., VAN DE VIS, J. W. Industrial dry electro-stunning followed by chilling and decapitation as a slaughter method in Claresse® (*Heteroclaris* sp.) and African catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v. 302(1-2), p.100–105, 2010.
- SAS - University Studio. Versão 3.1 basic, 2012/2014.
- SCHNEE, R. **Budenheim Phosphates for Seafood Processing**. Budenheim Chemische Fabrik, 2000, 11p.
- SEIFZADEH, M., MOTALLEBI, A.A., MAZLOUMI, M.T. Evaluation of fat quality in packaged common kilka fish soaked in whey protein compared with sodium alginate. **Scholarly Journal Agricultural Science**, v.2, n.2, p. 26-31, 2012.
- SIKORSKI, Z.E., KOLAKOWSKA, A., BURT, J.R. In: SIKORSKI, Z.E. **Post harvest biochemical and microbial changes, in Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation**. Zaragoza: CRC Press, Boca Raton, 1994, 55–75p.

- SHENOUDA, Y. K. S. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Advances in Food Research**, v.26, p.275 – 311, 1980.
- SMITH, P. G. Introduction to food process engineering. In: **Food science text series United Kingdom**. Chapter 11, 2° ed. 4419-7662p, 2011.
- SOBRAL, P.J.A.; HABITANTE, A.M.Q.B. Phase transitions of pigskin gelatine. **Food Hydrocolloids**, v.15, n. 4-6, p. 377-382, 2001.
- SOCOL, M. C. H. **Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*), minimamente processada e armazenada sob refrigeração**. 2002. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.
- SORENSEN, T.L., MOLLER, J.V., NISSEN, P. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. **Science**, v.304, p.1672–1675, 2004.
- SUÁREZ-MAHECHA, H., BEIRÃO, L., FRANCISCO, A., NAKAGHI, L. S. O. PARDO-CARRASCO, S. C. Efeito do resfriamento sobre a textura post-mortem da carne do peixe matrinxã (*Brycon cephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.1067–1073, 2007.
- TORNBERG, E. Effect of heat on meat proteins-implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, v.70, p.496–508, 2005.
- VAN DE VIS, H., KESTIN, S., ROBB, D., OEHLenschläger, J., LAMBOOIJ, B., MÜNKNER, W., KUHLMANN, H., KLOOSTERBOER, K., TEJADA, M., HUIDOBRO, A., OTTERÅ, H., ROTH, B., SØRENSEN, N.K., AKSE, L., HAZEL BYRNE, H. NESVADBA, P. Is humane slaughter of fish possible for industry? **Aquaculture Research**, v.34, p.211–220, 2003.
- VYNCKE, B.W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.72, n.12, p.1084-1087, 1970.
- WILKINSON, R. J., PATON, N., PORTER, M. J. R. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). **Aquaculture**, v. 282(1-4), p.26–32, 2008.
- ZHU, S., RAMASWAMY, H., SIMPSON, B. Effect of high-pressure versus conventional thawing on color, drip loss and texture of Atlantic salmon frozen by different methods. **LWT- Food Science and Technology**, v.37, n.3, p.291–299, 2004.