GIAN STEFANI PACOLA

Teste do Cometa: aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia
(*Oreochromis niloticus* - LINNAEUS, 1758)

São Paulo

2013

GIAN STEFANI PACOLA

Teste do Cometa: aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia
(*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758)

São Paulo
2013

GIAN STEFANI PACOLA

Teste do Cometa: aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia
(*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian

De acordo: _____

Orientador(a)

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2748
FMVZ

Pacola, Gian Stefani

Teste do Cometa: aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia (*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758) / Gian Stefani Pacola. -- 2013.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian.

1. Teste do Cometa. 2. Conservação de pescado. 3. Vida útil. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Teste do Cometa: aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia (*Oreochromis niloticus* – Linnaeus, 1758)", protocolado sob o nº 2102/2010, utilizando 937 (novecentos e trinta e sete) tilápias, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/02/2011.

São Paulo, 4 de dezembro de 2012

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PACOLA, Gian Stefani

Título: **Teste do Cometa:** aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia
(*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Colaboradores:

Pesquisadora Científica Juliana Cunha – ITAL

Pesquisador Científico Leonardo Tachibana - ITAL

Consultor Científico Helio Junji Shimozako

Consultor Científico Euro de Barros Couto Junior

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento muito especial à minha namorada, Fernanda Arellano, por todas as inúmeras "olhadas" no texto, tabelas, montagens, edições de fotos e tudo mais que ela tenha me ajudado esse tempo todo. Um grande beijo! =***

Muito obrigado aos meus pais, também por tudo que fizeram até esse dia, todo o apoio, paciência e ajuda oferecida. Obrigado!

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Simone de Carvalho Balian, por todas as conversas, discussões e decisões que envolveram o antes, durante e depois desse projeto!

Ao pessoal do ITAL e Instituto de Pesca, Juliana Cunha e Leonardo Tachibana, pelas sugestões e planejamentos ao longo do projeto!

À empresa e funcionários da Royal Fish, por toda a disposição e fornecimento do material; e em especial ao Juliano Kubitza, pela disposição do material e ajuda pelos dias de ausência no frigorífico!

Ao pessoal do VPS; funcionários, estagiários e residente; pela ajuda geral fornecida. Em particular, ao Prof. Nilson Roberti Benites e a Técnica de Nível Superior Priscila Anne Melville pelas sugestões e fornecimento do material; e também ao Prof. Paulo Brandão, pela disposição de material e laboratório, fora as muitas horas de conversas! Agradecimentos também ao Prof. Jorge Dias do VPT, pela ajuda e apoio ao projeto!

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação e da biblioteca por todas as dúvidas tiradas, em particular à bibliotecária da FMVZ/USP, Sra. Elza Faquim por toda a ajuda e atenção dedicadas!

Thanks very much!!!

RESUMO

PACOLA, G. S. **Teste do Cometa:** aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia (*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758). [Comet Assay: application in shelf-life study of Tilapia (*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758) fillets]. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o desempenho do Teste do Cometa em confronto com métodos convencionais de avaliação de frescor e qualidade higiênica e sanitária de filés de Tilápia (*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758) refrigerados, durante a vida útil comercial, correlacionando os seus resultados com aqueles obtidos nas análises físico-químicas, microbiológicas e sensorial. As análises foram realizadas nos dias zero – cinco – nove – 12 – 14 pós-processamento dos filés. Em cada dia de estudo foram processados três filés diferentes, pertencentes ao mesmo lote de produto. O protocolo foi repetido em três momentos diferentes, completando 45 amostras. Nos resultados encontrou-se no dia zero e no quinto dia útil do produto, condições impróprias para consumo com relação aos microrganismos psicrótrófos e mesófilos, respectivamente, e o tipo de cometa predominante foi o tipo 3. Aos nove dias de vida útil dos filés, a média dos parâmetros Trimetilamina, Odor e Intenção de Compra indicavam produto impróprio e no teste do cometa predomina o tipo 5. Aos 12 dias de vida útil dos filés de Tilápia, refrigerados, bases voláteis nitrogenadas totais e textura obtiveram resultados impróprios, enquanto que a aparência se revelou imprópria a partir do 14º dia. Concluiu-se que o teste do cometa se presta para o estudo de vida útil de filés de Tilápia refrigerados e apresentou correlação com os métodos convencionais de avaliação de frescor e qualidade higiênica e sanitária do pescado. A partir do 9º dia de estudo predominavam cometas do tipo 5, indicativos do grau máximo de dano celular e fragmentação de DNA das células, pelo teste do cometa, o que coincidiu com a rejeição da Intenção de Compra na análise sensorial.

Palavras-chave: Teste do Cometa. Conservação de pescado. Vida útil.

ABSTRACT

PACOLA, G. S. **Comet Assay:** application in shelf-life study of Tilapia (*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758) fillets. [Teste do Cometa: aplicação ao estudo de vida útil de filés de Tilápia (*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758)]. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The present study aimed to evaluate the performance of the Comet assay in comparison with conventional methods of assessing freshness and hygienic and sanitary quality of chilled Tilapia (*Oreochromis niloticus* - Linnaeus, 1758) fillets, over the shelf-life, correlating their results with those obtained in the physical-chemical, microbiological and sensory. The analyzes were performed on days zero - 5 - 9 - 12 - 14 post-processing of the fillets. In each study day were processed three different fillets, belonging to the same batch of product. The protocol was repeated at three different times, completing 45 samples. The results showed that at the zero and fifth day of the product, improper conditions for consumption, with respect to psychrotrophic and mesophilic microorganisms, respectively, and the predominant type of comet was the type 3. At nine days of the fillets shelf-life, the average of the parameters trimethylamine, odor and purchase intent indicate improper product, and at the comet assay predominate type 5. At 12 days of the shelf-life of chilled tilapia fillets, total volatile basic nitrogen and texture results obtained improper conditions, while appearance showed improper at the 14th day. It was concluded that the comet assay lends itself to the study of shelf-life of chilled tilapia fillets and correlated with conventional methods of assessing freshness and hygienic and sanitary qualities of fishery. From the 9th day of study, predominated comets type 5, indicative of maximum degree of cell damage and DNA fragmentation of the cells by the comet assay, which coincided with the rejection of Purchase Intent at sensory analysis.

Keywords: Comet Assay. Fishery conservation. Shelf-life.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da Linha de Processamento de Filé de Tilápia.....	32
Figura 2 - Esquema da sequência de análises após a produção dos filés	34
Figura 3 - Indicação da localização de retirada de alíquotas analíticas do filé de Tilápia em cada uma das amostras, em cada um dos dias de estudo	42
Figura 4 - Diferenciação dos tamanhos dos cometas de células bacterianas de células musculares de Tilápia, aumento de 400X.	45
Figura 5 - Fotos dos cometas característicos do filé de Tilápia durante a Padronização do Teste do Cometa, aumento de 200X	48
Figura 6 - Fotos dos cometas característicos do filé de Salmão durante a Padronização do Teste do Cometa, aumento de 200X	49
Figura 7 - Classificação visual dos cometas do filé de Tilápia na padronização do Teste do Cometa, aumento de 400X	51
Figura 8 - Classificação visual dos cometas do filé de Salmão na padronização do Teste do Cometa, aumento de 400X	52
Figura 9 - Solução de <i>E. coli</i> mantida em temperatura de 0° a 5° C na concentração 1 da escala de McFarland, aumento de 200X	53
Figura 10 - Solução de <i>E. coli</i> mantida em temperatura de 0° a 5° C na concentração 10 da escala de McFarland, aumento de 200X.....	53
Figura 11 - Solução de <i>E. coli</i> mantida em temperatura de 20° a 25° C na concentração 1 da escala de McFarland, aumento de 200X	53
Figura 12 - Solução de <i>E. coli</i> mantida em temperatura de 20° a 25° C na concentração 10 da escala de McFarland, aumento de 200X.....	53
Figura 13 - Artefatos encontrados nas lâminas preparadas a partir do filé de Tilápia na padronização do Teste do Cometa, no 9º dia de análise, aumento de 200X.....	54
Figura 14 - Artefatos encontrados nas lâminas preparadas a partir do filé de Salmão na padronização do Teste do Cometa, no 9º dia de análise, aumento de 200X.....	54

Figura 15 - Classificação visual dos cometas do filé de Tilápia no Teste do Cometa, aumento de 400X	73
Figura 16 - Artefatos encontrados nas lâminas preparadas a partir do filé de Tilápia no Teste do Cometa, no 14º dia de análise, aumento de 200X	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Produção de pescado no mundo – 1950 – 2010.....	19
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição em porcentagem (%) de DNA danificado no núcleo celular e seus respectivos tipos de cometa, variando de 1 a 5, segundo Duarte (2009)	45
Tabela 2 -	Distribuição do DNA e classificação na Padronização do Teste do Cometa por dia de análise dos filés de Tilápia e Salmão, São Paulo, 2013	47
Tabela 3 -	Resultados dos parâmetros físico-químicos do Primeiro Momento em cada dia de análise, São Paulo, 2013	55
Tabela 4 -	Resultados dos parâmetros físico-químicos do Segundo Momento em cada dia de análise, São Paulo, 2013	56
Tabela 5 -	Resultados dos parâmetros físico-químicos do Terceiro Momento em cada dia de análise, São Paulo, 2013	57
Tabela 6 -	Contagens bacterianas do Primeiro Momento de cada amostra por dia de análise, São Paulo, 2013	60
Tabela 7 -	Contagens bacterianas do Segundo Momento de cada amostra por dia de análise, São Paulo, 2013	61
Tabela 8 -	Contagens bacterianas do Terceiro Momento de cada amostra por dia de análise, São Paulo, 2013	62
Tabela 9 -	Análise Sensorial por Intenção de Compra nos momentos e dias de análise, São Paulo, 2013	66
Tabela 10 -	Análise Sensorial por Odor nos momentos e dias de análise, São Paulo, 2013	67
Tabela 11 -	Análise Sensorial por Aparência nos momentos e dias de análise, São Paulo, 2013	68
Tabela 12 -	Análise Sensorial por Textura nos momentos e dias de análise, São Paulo, 2013	69
Tabela 13 -	Distribuição, em porcentagens (%) dos tipos de Cometa observados em filés de Tilápia, refrigeradas, nos diferentes dias de análise, para cada um dos momentos do estudo, São Paulo – 2013	72

Tabela 14 - Coeficientes de Cronbach para as variáveis estudadas no Teste do Cometa, São Paulo, 2013	77
Tabela 15 - Teste de Cochran para as variáveis estudadas no Teste do Cometa, São Paulo, 2013	78
Tabela 16 - Correlações de Spearman entre as variáveis escalares e categóricas do Teste do Cometa, São Paulo, 2013	80
Tabela 17 - Correlações de Spearman das variáveis categóricas com as leituras do Teste do Cometa, São Paulo, 2013.....	81
Tabela 18 - Correlações de Spearman das variáveis escalares com as leituras do Teste do Cometa, São Paulo, 2013	82
Tabela 19 - Correlação dos tipos de cometas por dia de análise dos parâmetros impróprios, São Paulo, 2013	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CTC	Centro de Tecnologia de Carnes
DNA	Desoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
EDTA	Etilenodiamino Tetracético
FAO	<i>Food and Agriculture Organization for the United Nations</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
N-BVT	Bases Voláteis Nitrogenadas Totais
NMP	Número Mais Provável
PB	Paraíba
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato-salino)
pH	Potencial Hidrogeniônico
POA	Produtos de Origem Animal
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SDS	Sódio Dodecil-Sulfato

SP	São Paulo
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBE	Tampão Tris-Borato EDTA
TMA	Trimetilamina
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Porcentagem / Porcento
+	Positivo
<	Menor
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
µL	Microlitro
cm	Centímetro
g	Gramas
h(s)	Hora(s)
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA	24
2.1	UTILIZAÇÃO DO FRIO NA CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL (POA)	24
2.2	DETERIORAÇÃO DE PESCADO	26
2.3	TESTE DO COMETA	28
3	OBJETIVO	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	PROCESSAMENTO E COLETA DE AMOSTRAS	31
4.2	TESTES PRELIMINARES COM O TESTE DO COMETA	33
4.3	PLANEJAMENTO DAS AMOSTRAS DE FILÉ DE TILÁPIA PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DO COMETA	33
4.4	ANÁLISE SENSORIAL	34
4.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	35
4.6	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	36
4.7	TESTE DO COMETA E PADRONIZAÇÃO DO TESTE	36
4.7.1	Padronização do Teste do Cometa	37
4.7.2	Execução do Teste do Cometa	38
4.7.3	Soluções para o Teste do Cometa	38
4.7.3.1	Preparo do Tampão TBE 0,45M - solução estoque	39
4.7.3.2	Preparo da Solução de Lise	39
4.7.3.3	Preparo do Tampão PBS pH 7,4	40
4.7.3.4	Preparo das Soluções de Agarose	40

4.7.3.5	Preparo da Coloração Sybr Gold	40
4.7.4	Protocolo de execução do Teste	41
4.7.4.1	Preparação das Lâminas Pré-amostras	41
4.7.4.2	Preparação das Amostras	41
4.7.4.3	Filtração das Amostras	42
4.7.4.4	Preparação das Lâminas Pós-amostras	42
4.7.4.5	Lise nas Lâminas	43
4.7.4.6	Formação dos Cometas	43
4.7.4.7	Coloração com Sybr Gold	44
4.7.5	Leitura e Análise das lâminas	44
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	PADRONIZAÇÃO DO TESTE DO COMETA	47
5.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	55
5.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	59
5.4	ANÁLISES SENSORIAIS	66
5.5	TESTE DO COMETA	72
5.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	77
6	CORRELAÇÃO DOS MÉTODOS CONVENCIONAIS COM O TESTE DO COMETA	85
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
8	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

O consumo e a produção mundial de pescado têm aumentado anualmente devido à busca por uma vida mais saudável. O pescado é rico em proteínas de alto valor nutritivo, tem alta digestibilidade, possui em ácidos graxos poli-insaturados e possui baixos níveis de colesterol (SANTOS, 2006). Essas são algumas características que fazem do pescado um produto tão atrativo como fonte de nutrientes nobres para aqueles que buscam uma alimentação mais saudável.

O Brasil, mesmo sendo reconhecido internacionalmente por sua biodiversidade e grandes reservas hidrográficas, nos últimos anos tem apresentado uma alta produção pesqueira predatória em seu litoral, afetando o ecossistema marinho. O equilíbrio entre a demanda e a produção sustentável exige fundamentalmente higiene no manuseio e manutenção rigorosa da cadeia de frio, evitando perda de frescor e desperdício com deterioração precoce e evitável (PIMENTEL; PANETTA, 2003). De acordo com dados da FAO – *Food and Agriculture Organization for the United Nations* (2012) a produção pesqueira de captura mundial tem se estabilizado nos últimos anos, sugerindo um possível esgotamento de fontes de pescado no ecossistema (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Produção de pescado no mundo – 1950 - 2010

Million tonnes

Fonte: FAO (2012).

Tal estagnação de produção não parece afetar a aquicultura, como também pode ser visto no gráfico 1 (página 19). Seu crescimento mundial nas décadas de 50 a 70 era de 5,2%, chegando a 16,3% na década de 90. Porém, após o ano 2000, o crescimento mundial de aquicultura passou a ser 32,1% e vem aumentando desde então (El-SAYED, 2006). Segundo a FAO (2012), a criação de Tilápia, originária do Egito, atualmente é realizada em diversos países do mundo com variados aspectos climáticos, sendo a América responsável por 9% da produção mundial de Tilápia. Tais mudanças de clima e temperatura podem afetar tanto a criação e produção do Pescado, como influenciar a manipulação e processamento de seus produtos.

A temperatura de conservação de um alimento depende muito das condições de armazenamento e métodos de conservação utilizados, tendo grande influência na vida útil do produto. Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA, Decreto-Lei 30.691, de 1952 (BRASIL, 1952), o pescado *in natura*, pode ser comercializado em três diferentes formas de conservação:

- Pescado Fresco = dado ao consumo sem ter sofrido qualquer processo de conservação, a não ser ação do gelo (próximo a 0°C).
- Pescado Resfriado = devidamente acondicionado em gelo e mantido em temperatura entre -0,5 a -2°C.
- Pescado Congelado = tratado por processos adequados de congelamento, em temperatura não superior a -25°C.

Porém, nos estabelecimentos comerciais, as temperaturas de conservação encontradas são normalmente superiores às descritas na legislação, devido às falhas diversas na cadeia de processamento. Mesmo assim, a temperatura de conservação de um produto necessita ser aquela mínima para garantir adequada manutenção das qualidades e características sensoriais, além de garantir a segurança do produto ao consumidor (CHESCA et al., 2001).

Para os produtos que exigem refrigeração, a manutenção da cadeia de frio é condição estratégica e crítica para a garantia dos aspectos que compõem a qualidade sensorial, comercial e até nutricional do produto, como, por exemplo, o

pescado. A sua manutenção deve ser rigorosa em todas as etapas que compõem o sistema produtivo, englobando produção, transporte, armazenamento e venda. A correta manutenção da cadeia de frio evita falhas com perdas irreparáveis no alimento, diminuição de vida útil e riscos ao consumidor (GÓES et al., 2004).

O uso das baixas temperaturas visa retardar reações químicas, retardar a ação de enzimas autolíticas e diminuir a multiplicação de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos no alimento, causando deterioração progressiva no produto. Em alimentos perecíveis, como o pescado, a conservação com a utilização de gelo e a frigorificação são condições fundamentais na cadeia do pescado com valor comercial, frescor e garantia de suas qualidades nutricionais para o consumidor (VIEIRA et al., 2000). Outros fatores também interferem nos processos de deterioração do pescado, tais como a espécie do peixe, porcentagem de gordura, tamanho, período reprodutivo ou não, técnica de pesca utilizada, forma de acondicionamento dos peixes a bordo, habitat, estação de captura, entre outros (ABABOUC et al., 1996).

Logo, a deterioração do pescado é causada principalmente pela ação de bactérias, oxidação de lipídeos e autólise enzimática dos tecidos. A carga microbiana do pescado é muito importante devido à alta perecibilidade, alto teor de umidade e elevadas concentrações de nutrientes a base de moléculas de baixo peso molecular, isto é, de fácil aproveitamento pelos microrganismos.

Perante tais características, já se conhece alguns procedimentos e etapas críticas no processo produtivo do pescado, tais como: o rigoroso controle de temperatura em todas as etapas de produção; o rigoroso controle de tempo e temperatura durante a manipulação do produto; o elevado nível de higiene pessoal e ambiental exigido durante a sua manipulação (SANTOS, 2006).

Participam dos processos de deterioração do pescado, bactérias como *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* spp e *Moraxella* spp (VIEIRA, 2004) que durante os processos de degradação e putrefação geram odores desagradáveis a base de amônia e gás sulfídrico. Além disso, a deterioração ocorrida no pescado é causada principalmente por microrganismos psicrotróficos, capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, abaixo de 10°C. Por isso a vida útil

do produto não depende somente da conservação pelo frio, mas também das condições gerais de higiene sob as quais há manipulação – denominado de "Boas Práticas de Fabricação - BPF". É necessário também implementar sistemas para o monitoramento de pontos compreendidos como críticos, isto é, períodos, etapas ou fases nas quais há possibilidade de contaminar o produto, aumentando seu monitoramento estratégico para se conseguir segurança sanitária do produto, e eliminando, reduzindo ou impedindo a ocorrência de agentes, físicos, químicos ou biológicos considerados tóxicos ou patogênicos (SURENDRAN et al., 1989).

Situações como quebras na cadeia de frio e oscilações de temperatura levam a alterações sensoriais, multiplicação microbiana, aumento de condensação de água e formação de cristais de gelo, gerando danos às células do tecido celular no alimento.

Testes simples, rápidos e de baixo custo que consigam avaliar e identificar; com praticidade e eficácia os agravos sofridos pelo produto são sempre desejados pelos setores produtivos e de pesquisa. O Teste do Cometa, ou a Eletroforese em Microgel de Célula Única, é uma técnica de varredura que permite detectar e quantificar o DNA fragmentado de células que foram lesionadas por alguma causa. Permite também estabelecer uma classificação de grau de dano sofrido pelo tecido estudado.

De acordo com Duarte (2009), essa técnica vem sendo utilizada em várias áreas da pesquisa científica, como Reprodução, pesquisas de Câncer em humanos e análises de Alimentos Irradiados. O autor considera que o Teste do Cometa é uma ferramenta viável para se avaliar falhas na cadeia de frio.

É sabido que falhas na cadeia de frio geram danos celulares, que provocam fragmentação do DNA nuclear em tecidos orgânicos de produtos mantidos refrigerados e congelados. Entende-se que o Teste do Cometa, por se tratar de uma técnica rápida e de certa forma, de baixo custo, merece atenção especial, no sentido de se desenvolver estudos que permitam esclarecer se pode ser utilizada como um recurso viável na identificação de alterações teciduais, de diversos produtos alimentícios, como os produtos de origem animal, altamente

perecíveis, como carnes, pescado que necessitam fundamentalmente da manutenção de boas práticas de higiene e de rigorosa cadeia de frio.

Sob as considerações acima apresentadas, tomando como base teórico-prática os resultados de Duarte (2009), decidiu-se explorar o tema, desenvolvendo este estudo, confrontando o desempenho do Teste do Cometa, em relação às metodologias convencionais utilizadas para avaliar estado de frescor/deterioração da tilápia filetada refrigerada, durante a vida útil comercial.

2 REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA

A ação do frio, portanto, é essencial na conservação do pescado para manutenção do frescor e da segurança sanitária do produto até o consumidor, o qual muitas vezes é incapaz de julgar sobre a presença de perigos ou alterações que esse produto possa conter.

No decorrer das próximas páginas deste trabalho, é possível observar a necessidade da utilização do frio nos Produtos de Origem Animal - POA, assim como a manutenção da qualidade microbiológicas desses produtos, especialmente o pescado. A ação desses agentes deteriorantes pode gerar alterações no DNA celular, fazendo com que o teste do cometa consiga detectar alterações relativas à qualidade do alimento.

2.1 UTILIZAÇÃO DO FRIO NA CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL (POA)

A cadeia de frio é muito importante nas etapas da produção da maioria dos produtos de origem animal; desde o processamento, armazenamento, transporte e venda ao consumidor. Quebras ou interrupções podem resultar em alterações e perdas irreparáveis de qualidade das propriedades sensoriais do produto, como: sabor, textura, odor e cor (GÓES et al., 2004). Com relação ao armazenamento de alimentos, devem-se respeitar as temperaturas definidas pelos fabricantes, variáveis de acordo com o tipo de produto, visando preservar ao máximo as características que definem o produto, no máximo frescor, valor comercial e vida útil (TAOUKIS; LABUZA, 1989).

Germano e Germano (2008) afirmam que as temperaturas indicadas para conservação de alimentos devem ser: $< 10^{\circ}\text{C}$ para alimentos resfriados, $< 5^{\circ}\text{C}$ para alimentos refrigerados e $< -15^{\circ}\text{C}$ para alimentos congelados; mas também podem ser seguidas as orientações de conservação descritas pelos fabricantes

nas embalagens. Vieira (2004) reafirma que baixas temperaturas são utilizadas para retardar as reações químicas e a ação dos microrganismos. No caso especial do pescado, a utilização de gelo é bastante recomendada, mesmo quando da utilização de ambientes frigorificados, mantendo o produto sob temperaturas que variam de -1°C a $+1^{\circ}\text{C}$, isto é, não permitindo o congelamento dos tecidos, mas oferecendo a menor temperatura possível sob a condição refrigerada. Esta prática é pouco frequente na comercialização geral do pescado. Produtos processados como filés e postas, em geral, são disponibilizados no comércio varejista de acordo com a recomendação do fabricante para manutenção refrigerada, em temperaturas de 0° a 5°C .

Duarte (2009) demonstra em seu trabalho, que quebras na cadeia de frio e oscilações de temperaturas, durante armazenamento, provocam danos celulares detectáveis com o Teste do Cometa. Ao aplicar o Teste do Cometa em fígados de frango congelados à -15°C por 48hs e compará-los com fígados de frango congelados à -15°C por 24hs, descongelados e recongelados à -15°C , foi possível perceber uma distribuição de cometas tipo 2 (74%) e tipo 3 (26%) no frango mantido congelado, enquanto o frango descongelado apresentou diversa distribuição de cometas tipo 2 (13%), tipo 3 (29%), tipo 4 (39%), e tipo 5 (19%), indicando maior dano sofrido pelo produto nos produtos que descongelaram e foram recongelados.

Em seu trabalho, Góes et al. (2004) buscou inadequações nas temperaturas de armazenamento de POA em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador, Bahia. Cerca de 30% de 219 carnes e derivados, e cerca de 25% de 319 leites e derivados, eram mantidos fora da temperatura de conservação recomendada, nos estabelecimentos visitados. Chesca et al. (2001) estudando inadequações na conservação de POA, encontraram em 10 estabelecimentos comerciais visitados (açougues e supermercados), temperaturas inadequadas de câmaras refrigeradas, além de péssima higienização e outras irregularidades.

2.2 DETERIORAÇÃO DO PESCADO

No caso de Pescado, além de diversas características intrínsecas que podem afetar a deterioração, a microbiota específica também possui grande influência. Acredita-se que peixes de águas quentes, com microbiota predominantemente mesófila, apresentam maior vida útil do que peixes de águas geladas, com microbiota predominantemente psicrófila, e assim preservam por mais tempo suas características de qualidade e frescor em temperaturas de refrigeração (ABABOUC et al., 1996). Os autores também afirmam que a deterioração em pescado é causada principalmente pela ação de bactérias e oxidação de lipídios, enquanto a ação de enzimas autolíticas possui um menor papel na deterioração. A oxidação lipídica e a deterioração bacteriana são os processos que mais precocemente provocam o aparecimento de odores e sabores desagradáveis que inviabilizam a comercialização e consumo do pescado, devendo-se salientar que tais fenômenos são facilitados, quando não acelerados em situações de falhas na cadeia de frio e de precárias condições de higiene.

Sendo assim, pode-se considerar como estratégico na cadeia do pescado o controle de temperatura e o rigor higiênico. O controle desses dois aspectos deve ser mantido no desembarque, evitando manuseio brusco, traumatizando os peixes; a filetagem, com equipamentos mal higienizados ou inadequados para esse fim; o transporte e venda, com falhas de temperatura, acondicionamento e higiene (VIEIRA et al., 2000). A autora, estudando a cadeia produtiva da tilápia em Campina Grande, PB, encontrou crescentes níveis de coliformes e organismos mesófilos, sugerindo contaminações e más condições higiênico-sanitárias ao longo do processamento.

Ababouch et al. (1996) afirmam que somente algumas bactérias como *Shewanella putrefaciens* e algumas *Pseudomonas* spp são responsáveis pela deterioração do pescado. Em seus estudos, os autores compararam a cinética desses organismos na deterioração de um grupo de Sardinhas (*Sardinella longiceps*) inteiras conservadas à temperatura ambiente e outro grupo conservado em gelo, encontrando mais intensa e mais rápida multiplicação microbiana no

pescado à temperatura ambiente. Observou também uma maior população de mesófilos à temperatura ambiente do que o pescado conservado em gelo, que possuía maior microbiota de psicrotróficos. Surendran et al. (1989) estudou peixes de águas quentes como: Sardinha, Tilápia (*Oreochromis mossambica*), Cavalinha (*Rastrelliger kanagurta*), "Milkfish" (*Chanos chanos*), e "Green Chromide" (*Etroplus suratensis*) e identificou, nas quase 2 semanas de vida útil apresentadas pelos produtos, uma inversão da microbiota mesófila para predominantemente psicrotrófica, principalmente *Pseudomonas*.

Alterações na estrutura e textura do tecido muscular do pescado também são encontradas durante a deterioração. Pornrat et al. (2007) afirmam que a textura do pescado "in natura" pode ser alterada durante armazenamento refrigerado. Os autores encontraram alterações nas fibras musculares, textura e firmeza do tecido, e concluíram que após seis dias de conservação, o camarão resfriado passa por grandes alterações estruturais que coincidem com sua rejeição identificada por análise sensorial. Sigurgisladdottir et al. (2000) acharam resultados semelhantes nas alterações estruturais de filés de Salmão quando submetidos ao congelamento lento e rápido, observando maior encolhimento de fibras no congelamento lento.

2.3 TESTE DO COMETA

O Teste do Cometa também é conhecido pela denominação de Eletroforese em Microgel de Célula Única. Os primeiros ensaios foram feitos em 1984 por Östling e Johanson¹ (apud DUARTE, 2009, p. 34). Esta técnica permite a visualização do DNA de células individuais, o que permite utilizá-la para estudos que pretendem monitorar estados ou níveis de danos celulares, provocados por diferentes causas. O princípio do teste se baseia no fato de que fragmentos de

¹ ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298, 1984.

DNA celular são liberados e em seguida submetidos a um campo elétrico. Estes migram para o ânodo formando uma estrutura bastante similar a um cometa, quando observado ao microscópio.

O Teste do Cometa é uma técnica de varredura e largamente utilizado em pesquisas para avaliar dano celular a partir de diferentes causas, com aplicações no estudo e monitoramento de câncer, de testes farmacológicos, avaliações de fertilidade e qualidade de alimentos, entre outras aplicações. É considerada uma técnica de baixo custo e rápida, utilizada no setor de alimentos desde 1993, quando Cerda et al. (1997) adaptaram-na para monitoramento de alimentos irradiados. Pode ser utilizada em diversos tecidos celulares, tanto vegetal como animal que tenham passado por algum tipo de processo.

Durante processos como aquecimento, resfriamento, congelamento e irradiação, o DNA celular sofre diferentes graus de danos o que provoca a sua fragmentação. Através da monitorização desses fragmentos de DNA, o Teste do Cometa pode identificar falhas como quebras na cadeia de frio e fontes de manipulação incorreta dos alimentos.

Tratando-se, por exemplo, de carnes, quaisquer falhas ocorridas em qualquer uma das etapas de processamento podem ser reveladas e quantificadas com a utilização do Teste do Cometa, permitindo-se discriminar qual ou quais provocam maiores danos celulares (CERDA et al., 1997; DUARTE, 2009).

A avaliação do dano celular é feita com base na diminuição da quantidade de DNA do núcleo e aumento progressivo para a “cauda do cometa” (ânodo). Quanto maior o dano no DNA celular, mais fragmentado estará e maior será a cauda do cometa, isto é, na eletroforese, os fragmentos de DNA correrão em direção à “cauda”. As células são classificadas progressiva e morfológicamente de acordo com a proporção de DNA em suas regiões (DUARTE, 2009).

Na literatura, sobre a utilização do Teste do Cometa no contexto dos alimentos, encontram-se mais frequentemente trabalhos relacionados à detecção e identificação de danos causados por processos de irradiação (CERDA et al., 1997; CERDA, 1998; KHAN; DELINCÉE, 1998; PARK et al., 2000), enquanto trabalhos que avaliam a influência do frio nos alimentos são encontrados em

menor número (CERDA; KOPPEN, 1998; FAULLIMEL et al., 2005). Na literatura nacional, Duarte (2009) utilizou o Teste do Cometa para avaliar a influência de refrigeração e congelamento em fígados de frango. Em congelamento rápido por utilização de Nitrogênio Líquido e congelamento lento através de freezer à -18°C , foi possível observar o maior dano recebido pelas células do fígado durante congelamento lento. Também observou-se que quanto mais longo o tempo de armazenamento dos fígados de frango, mesmo em temperatura indicada, maior é a degradação e dano recebido pelas células. Não foram identificados estudos com o Teste do Cometa envolvendo pescado.

Considerando a aplicabilidade do Teste do Cometa, a importância da manutenção da cadeia do frio para o pescado, a escassez de estudos relacionando o Teste do Cometa e o pescado com finalidade de estudar frescor e qualidade comercial; o presente estudo se propôs a confrontar o Teste do Cometa com metodologias convencionais de avaliação de frescor e condição higiênica, condições sanitárias e de deterioração de produtos de origem animal, e também empregá-lo para acompanhar a vida útil do filé de tilápia, apontando as modificações e transformações pelas quais o produto passa com tempo. Vale ressaltar que não existem estudos dessa natureza, até o momento da realização deste, tanto na literatura brasileira, quanto na internacional.

3 OBJETIVO

Avaliar o desempenho do Teste do Cometa em confronto com métodos convencionais de avaliação de frescor e qualidades higiênica e sanitária, de filés de Tilápia (*Oreochromis niloticus* – LINNAEUS, 1758) refrigerados, durante a vida útil comercial.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Avaliar o desempenho do Teste do Cometa em filés de tilápia refrigerados em diferentes dias após a produção dos filés para identificação de danos celulares, em confronto com técnicas convencionais.
- B. Avaliar a dinâmica do processo de deterioração de filés de Tilápia refrigerados, no decorrer da vida útil do produto, utilizando-se o Teste do Cometa, a Análise Sensorial, testes Microbiológicos e Físico-químicos convencionais.
- C. Correlacionar os resultados encontrados no Teste do Cometa com aqueles obtidos na Análise Sensorial, testes Microbiológicos e Físico-químicos convencionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A execução das análises envolveu duas instituições: o Laboratório de Físico-química do Setor de Higiene Alimentar do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, onde foram realizados os Testes do Cometa; e o Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia dos Alimentos – CTC/ITAL /SP, onde foram realizadas as Análises Sensoriais, Microbiológicas e Físico-químicas. Estabeleceu-se que as análises ocorressem concomitantemente, uma vez que todas as provas deveriam acontecer ao mesmo tempo, em dias pré-determinados. O ITAL/SP dispõe de setores específicos para a realização de análises de alimentos em cada uma das grandes áreas de estudo empregadas neste projeto: Sensorial, Físico-química e Microbiológica. Por esse motivo, subunidades de amostras de filés de Tilápia, do mesmo lote, origem, data de processamento e acondicionamento, foram direcionadas para a realização de cada natureza de análise.

4.1 PROCESSAMENTO E COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de filé de Tilápia foram obtidas em um frigorífico de processamento de pescado, localizado em Sumaré/SP, sob serviço de Inspeção Federal, e analisadas em três momentos de estudo, diferentes: Agosto de 2011, Novembro de 2011 e Abril de 2012. A decisão por realizar o estudo em três momentos diferentes teve por objetivos dar a oportunidade realística, de reconhecer um padrão técnico de produção no frigorífico, permitir a percepção de erros laboratoriais de processamento durante as análises e maior confiabilidade de que as análises respeitam as premissas de repetibilidade. O processamento do filé foi realizado desde o peixe inteiro até a embalagem final do filé, como mostra a figura 1. Em cada um dos momentos de estudo, o produto coletado originava-se de um só lote homogêneo, criados e processados igualmente. Os

filés foram mantidos inteiros e acondicionados em caixas isotérmicas refrigeradas para serem transportados ao laboratório e câmara refrigerada do ITAL/SP, com percurso de cerca de 30 minutos; e ao laboratório da FMVZ-USP, com percurso máximo de duas horas, sendo então armazenados sob temperatura de refrigeração, entre 0 e 5°C, em cada um dos laboratórios. Essa faixa de temperatura foi escolhida, pois se trata da indicação de armazenamento do produto pela indústria produtora que se refere às condições de armazenamento normalmente encontradas no consumidor final.

Figura 1 - Fluxograma da Linha de Processamento de Filé de Tilápia

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

4.2 TESTES PRELIMINARES COM O TESTE DO COMETA

Considerando a escassez de informações sobre a utilização do Teste do Cometa, foi necessário, previamente às análises das amostras em estudo, explorar a metodologia com diferentes substratos, reconhecendo morfologias diferentes de células e formação de cometas e do comportamento do próprio Teste, perante diferentes substratos. Também possibilitou o desenvolvimento das habilidades necessárias para executá-lo da forma mais padronizada possível.

Escolheu-se como substratos de estudo: filé de Tilápia, filé de Salmão (*Salmo salar*) e quatro soluções distintas de *E. coli*, analisadas, cada uma delas por 10 dias consecutivos. Os detalhes da padronização estão descritos no item 4.7.1 (página 37).

4.3 PLANEJAMENTO DAS AMOSTRAS DE FILÉ DE TILÁPIA PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE DO COMETA

O estudo valeu-se da data de validade definida pelo frigorífico para o produto no mercado varejista, que é de 10 (dez) dias. A partir daí definiu-se os seguintes dias para as análises dos filés: zero – cinco – dez – 12 – 14 pós-processamento. Em cada um dos dias pré-determinados, foram estudadas três diferentes filés, pertencentes ao mesmo lote de produto, conforme esquema da figura 2.

Figura 2 - Esquema da sequência de análises após a produção dos filés

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

4.4 ANÁLISE SENSORIAL

Os testes e avaliações de Análise Sensorial foram realizados seguindo normas e metodologias definidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (1998) e por Meilgaard et al. (2006), as quais são utilizadas na rotina de trabalho do CTC/ITAL – Campinas/SP. Para cada um dos dias foram utilizadas 30 amostras de filés. Foram realizadas as análises de aceitabilidade, avaliando-se aparência, textura e odor (MEILGAARD et al., 2006). Foram convidadas pessoas

que trabalham no ITAL/SP e são consumidoras de pescado para participar. Todos os avaliadores tinham, no mínimo, 21 anos e consumiam pescado com frequência de compra entre quinzenal e mensal.

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os testes Microbiológicos seguiram metodologia da *American Public Health Association* - APHA (APHA, 2001) e *International Organization for Standardization* - ISO (ISO 13720, 2010). Para cada dia de estudo foram analisadas três unidades amostrais diferentes (filés de tilápia), pertencentes ao mesmo lote do produto.

No dia considerado zero, dia de obtenção das amostras, foram realizadas análises de caracterização microbiológica do produto, isto é, os parâmetros relativos ao padrão de identidade e qualidade relativos ao produto, quais foram: pesquisa de *Salmonella* spp, contagem de *Staphylococcus aureus*, contagem de Clostrídios sulfito redutores, Numero mais provável de Coliformes Termotolerantes, Contagem de Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis Mesófilos Totais, Contagem de Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis Psicrotróficos, Contagem de *Pseudomonas* spp e de Enterobactérias. Caracterizado o produto e considerado de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente, foi então considerado viável para consumo e só então foram determinadas as análises que seriam realizadas durante o estudo de vida útil. Estas análises foram: Contagem Padrão de Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis Psicrotróficos a 7°C, Contagem de *Pseudomonas* spp e de Enterobactérias.

4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises Físico-químicas seguiram metodologias reconhecidas (BRASIL, 1999; HORWITZ e LATIMER, 2005) e compreenderam: determinação do pH, quantificação de Nitrogênio de Bases Voláteis Totais (N-BVT) e de Trimetilamina (TMA); sendo esses os parâmetros mínimos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através do Decreto-lei 30.691/1952 - RIISPOA (BRASIL, 1952) para a avaliação do estado de frescor/deterioração do pescado em geral. Aqui também foram utilizadas três unidades amostrais diferentes de filés por dia de estudo, em cada momento.

4.7 TESTE DO COMETA E PADRONIZAÇÃO DO TESTE

Antes de dar início ao Teste do Cometa com as amostras de filé de tilápia, julgou-se necessário realizar a Padronização do Teste. Tomou-se como prudente realizar este protocolo, pois além da escassa literatura sobre o uso do Teste do Cometa no setor alimentício, aqueles existentes na literatura quase não estudaram matrizes orgânicas ao longo do tempo, como é o caso deste estudo, principalmente com Pescado, sendo tema totalmente desconhecido. Tendo por conduta preventiva evitar situações desconhecidas e inesperadas durante o estudo dos filés de Tilápia, a Padronização do Teste, permitiu explorar a técnica e desenvolver habilidades necessárias para a realização deste estudo. Estabeleceu-se um protocolo, com o objetivo de se conhecer sobre o desempenho do teste frente a células de tecido muscular da Tilápia e também identificar a sua capacidade de detecção de dano celular provocado pelos processos de autólise e deterioração microbiota natural pela qual passa o filé no decorrer de sua vida útil, sob refrigeração.

A partir do protocolo do Teste do Cometa, utilizado por Duarte (2009), introduziu-se algumas alterações nas proporções de Reagentes e Amostra,

visando maior e melhor visualização de células originárias do tecido animal. Essas alterações estão descritas no item 4.7.4 (página 41).

Abaixo estão descritos detalhadamente as etapas que envolveram a Padronização do Teste do Cometa separadamente da aplicação do Teste do Cometa propriamente dito, e em sequência os protocolos comuns de ambas as etapas.

4.7.1 Padronização do Teste do Cometa

Foram utilizadas para a padronização do Teste do Cometa, além do filé de Tilápia, filés de Salmão resfriados, adquiridos no mesmo frigorífico processador. Essa escolha buscou testar uma espécie de peixe de água doce e outra salgada, respectivamente.

Também foram utilizadas quatro suspensões puras de *E. coli*, buscando observar como o Teste do Cometa identifica bactérias, quais suas dimensões em relação a células de tecido muscular dos peixes. A inclusão da cultura de bactérias se fez em virtude de autores questionarem quanto a possibilidade de células bacterianas criarem “artefatos” durante a leitura dos cometas, prejudicando a interpretação destes.

Foram utilizadas duas concentrações diferentes da solução de *E. coli*: grau 1 e grau 10 da Escala de McFarland; e cada uma das concentrações foi armazenada em duas temperaturas diferentes: temperatura ambiente, de aproximadamente 20°C e temperatura de refrigeração, variando entre zero e 5°C. A submissão dos cultivos em temperaturas diferentes teve por objetivo oferecer condições diferentes que possibilitassem concentrações também diferentes de *E. coli*. Cada um dos quatro tipos de solução de *E. coli* continha cerca de 1,5 mL para utilização. A suspensão de *E. coli* foi cedida pelo Laboratório de Doenças Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (VPS) da FMVZ-USP.

Foram utilizados ao todo, dez filés de Tilápia e dez filés de Salmão, mantidos sob as mesmas condições de armazenamento. Foram transportados ao Laboratório de Físico-química de Alimentos da FMVZ-USP em caixa isotérmica refrigerada, não ultrapassando o período máximo de duas horas. Os filés foram mantidos sob refrigeração, entre zero e 5°C. Diariamente, por um período de dez dias, um filé de cada espécie de peixe, mais as quatro soluções de *E. coli* foram submetidas ao teste do cometa.

As amostras de tecido muscular do pescado seguiram normalmente a metodologia e protocolos descritos no item 4.7.4, e as soluções de *E. coli* foram incluídas a partir da etapa de Preparação das Amostras, como descrito no item 4.7.4.2 (página 41).

4.7.2 Execução do Teste do Cometa

Na realização do Teste do Cometa, foram utilizados três filés de Tilápia por dia de análise, totalizando 15 filés por momento de estudo, e 45 filés ao longo dos três momentos do experimento. Os filés analisados seguiram normalmente a metodologia e protocolos descritos no item 4.7.4 (página 41).

4.7.3 Preparo das Soluções necessárias

Foram preparadas quantidades das soluções necessárias para realizar o Teste do Cometa, proporcionais à quantidade de amostras que seriam processadas, isto é, não foi produzido o volume total estabelecido de forma padrão do protocolo. Tomou-se tal cuidado com a finalidade de evitar desperdícios de reagentes durante o decorrer do estudo e também não utilizar preparações com tempos mais prolongados de preparo. Adotou-se como regra produzir reagentes a cada 15 dias, mesmo que alguns deles pudessem ser utilizados de forma mais prolongada.

4.7.3.1 Preparo do Tampão TBE 0,45M - solução estoque

- NaOH concentrado (40%)
 - Diluir 40g de NaOH em 100mL de H₂O destilada
- Solução estoque de EDTA 0,5M
 - Diluir 93,05g de Na₂EDTA.2H₂O em 300mL H₂O destilada
 - Agitar a solução até total dissolução
 - Acertar pH para 8 com NaOH 40%
 - Completar com H₂O destilada até 500mL
- Tampão TBE 0,45M
 - Misturar:
 - 54g..... Tris 0,446M
 - 27,5g..... Ácido Bórico 0,445M
 - 20mL..... EDTA 0,5M, pH 8
 - Completar com H₂O destilada até 1L
 - Acertar pH para 8.4 com NaOH 40%

4.7.3.2 Preparo da Solução de Lise

- Preparo da Solução TBE 0,045M
 - Diluir 100mL do Tampão TBE 0,45M em 900mL de H₂O destilada
 - Acertar pH para 8.4 com NaOH 40%
- Solução Lise
 - Adicionar 25g de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)
 - Completar para 1L com Solução TBE 0,045M
 - Agitar lentamente a solução até total dissolução

4.7.3.3 Preparo do Tampão PBS pH 7,4

Misturar:

8g NaCl

0,2g KCl

2,68g Na₂HPO₄·7 H₂O = (1,44g Na₂HPO₄)

0,24g KH₂PO₄

- Completar para 1L com H₂O destilada
- Agitar a solução até total dissolução
- Acertar pH para 7.4 com HCl
- Refrigerar solução

4.7.3.4 Preparo das Soluções de Agarose

- Preparo da 1ª Agarose

- Adicionar 0,05g de L-agarose em 10mL de H₂O destilada
- Aquecer no bico de Bunsen até a transparência
- Deixar solução em banho-maria a $\pm 50^{\circ}\text{C}$ tampada

- Preparo da 2ª Agarose

- Adicionar 0,08g de L-agarose em 10mL de Tampão PBS
- Aquecer no bico de Bunsen até a transparência
- Deixar solução em banho-maria a $\pm 50^{\circ}\text{C}$ tampada

4.7.3.5 Preparo da Coloração Sybr Gold

- Adicionar 15 μL de SyBr Gold em 150mL PBS a -15°C

4.7.4 Protocolo de execução do Teste

O protocolo de execução foi baseado no trabalho de Duarte (2009), porém com algumas alterações em quantidade de reagentes por quantidade de amostras, para adequar a técnica ao tecido muscular do filé de Tilápia. O protocolo utilizado no trabalho de Duarte (2009) utilizava 2g de amostra com 20mL do reagente PBS, porém essa relação não apresentou resultado suficiente para visualização de cometas com o filé de Tilápia. Assim, foi padronizado 5g de amostra com 10mL do reagente PBS para melhor visualização dos cometas, como descrito no item 4.7.4.2 (página 41).

4.7.4.1 Preparação das Lâminas Pré-amostras

- Preparar Solução da 1ª Agarose
- Depositar 2 gotas da 1ª Agarose sobre a lâmina
- Sobrepor a extremidade de outra lâmina na solução e arrastar, deixando um rastro fino
- Secar à temperatura ambiente por 24 horas

4.7.4.2 Preparação das Amostras

- Retirar PBS da geladeira antes da preparação
- Picar com tesoura a amostra
- Colocar aproximadamente 5g da amostra¹ no Erlenmeyer com 10mL PBS gelado
- Agitar em banho de gelo por 5 minutos

¹Observação: foram retiradas partes diversas dos filés a fim de se obter uma amostra com representação do todo, com células da cauda, lombo e

barriga do filé; com cerca de 1,5 a 2 cm de altura e comprimento, como mostra a figura 3.

Figura 3 - Indicação da localização de retirada de alíquotas analíticas do filé de Tilápia em cada uma das amostras, em cada um dos dias de estudo

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

4.7.4.3 Filtração das Amostras

- Filtrar a mistura através de funis com gaze para um tubo de ensaio
- Filtrar novamente a mistura através com membrana de 125 μm para um novo tubo de ensaio

4.7.4.4 Preparação das Lâminas Pós-amostras

- Preparar a Solução da 2ª Agarose
- Misturar em novo tubo 100 μL do filtrado de células com 600 μL da 2ª Agarose.

- Pegar rapidamente 100µL da nova mistura e despejar sobre as lâminas com a 1ª agarose.
- Cobrir com lamínula e deixar 5 minutos em contato com superfície bem fria.
- Retirar cuidadosamente as lamínulas.

Observação: durante a Padronização do teste do cometa, as soluções de *E. coli* eram agitadas para uniformização da solução e entravam no processo a partir da mistura de 100µL da solução e 600µL da 2ª Agarose, seguindo, a partir desse ponto, os procedimentos normais da execução do teste.

4.7.4.5 Lise nas Lâminas

- Colocar as lâminas na Solução de Lise por 15 minutos
- Preparar TBE 0,045M e depositar na câmara de eletroforese

4.7.4.6 Formação dos Cometas

- Retirar as lâminas da Solução de Lise
- Colocar as lâminas na câmara de eletroforese
- Deixar descansar por 5 minutos
- Ligar a fonte (Ajuste aproximadamente de 2 min; 2V/cm)
- Retirar as lâminas da câmara
- Lavar as lâminas em H₂O destilada por 5min
- Secar em estufa por aproximadamente 20min a 40°C

- Preparar Solução de Sybr Gold

4.7.4.7 Coloração com Sybr Gold

- Proteger a cubeta contra incidência de luz
- Colocar as lâminas na solução de Sybr Gold por 20min a 4°C
- Lavar com H₂O destilada por 5min a 4°C

4.7.5 Leitura e Análise das lâminas

A lâmina deve ser observada ainda úmida com microscópio de fluorescência com filtro de excitação 420-490nm (emissão 510nm). Foram elaboradas três lâminas por amostra, buscando-se fotografar 50 cometas aleatórios observados percorrendo toda a extensão da lâmina. Feita coleção de imagens de cometas fotografados por lâmina, por dia de estudo, estas foram analisadas, uma a uma utilizando-se o Software CometScore™ da TriTek Corp. Além disso, todas as imagens dos cometas, por amostra e por dia de estudo foram avaliadas e classificadas em escores de intensidade de danos do DNA, visualmente, pelo autor deste estudo, independentemente das classificações realizadas pelo software, isto é, sem qualquer relação entre as duas avaliações, evitando assim qualquer influência ou viés entre as duas avaliações.

Na padronização do Teste do Cometa, as lâminas com as amostras de *E. coli* não foram avaliadas pelo Software e nem observadas a quantidade de cometas, por apresentarem uma quantidade inviável de leitura dos cometas, que se apresentaram em dimensões muito inferiores que aquelas das células musculares de tilápia e salmão, como pode ser observado na figura 4. Pelas dimensões dos cometas das células bacterianas não foi possível a sua classificação pelo software. Foi feita somente a leitura comparativa da aparência e

quantidade de cometas ao longo dos dez dias de estudo.

Figura 4 - Diferenciação dos tamanhos dos cometas de células bacterianas de células musculares de Tilápia, aumento de 400X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

LEGENDA: Seta Azul = Cometa de Tilápia, Seta Vermelha = Cometa bacteriano.

As classificações dos cometas realizadas com os dados fornecidos pelo Software CometScore® seguiram aquela feita por Duarte (2009), considerando a distribuição de DNA danificado no núcleo celular (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição em porcentagem (%) de DNA danificado no núcleo celular e seus respectivos tipos de cometa, variando de 1 a 5, segundo Duarte (2009)

Classificação do Cometa	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 4	Tipo 5
DNA no Núcleo	> 86,65 %	86,64 ~ 78,55 %	78,54 ~ 45,48 %	45,47 ~ 21,12 %	< 21,11%
DNA na Cauda	< 13,35 %	13,36 ~ 21,45 %	21,46 ~ 54,52 %	54,53 ~ 78,88 %	> 78,89%

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A fim de se montar o Banco de Dados para a realização das análises estatísticas, os dados obtidos foram reduzidos através de ferramentas matemáticas e estatísticas, como média aritmética, possibilitando o pareamento dos resultados obtidos. A transposição dos dados foi necessária para viabilizar as análises devido às limitações técnicas, em termos estatísticos, encontradas no estudo. Foram transpostos para cada dia de análise, independente dos momentos de estudo, 3 elementos amostrais em cada um dos parâmetros amostrados.

As variáveis foram divididas em Escalares (números, por sua natureza), que consistiram nas contagens e resultados de Microbiologia, Físico-química e Sensorial; e Categóricas do tipo "sim-não", que consistiram na classificação binária como 'próprio' ou 'impróprio' para o consumo, baseados em legislação vigente. Foi utilizado o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 20.0 para aplicação dos testes estatísticos, adotando-se nível de significância de 5% (0,050) para todos eles.

Os testes utilizados foram (ROSNER, 1986):

- Teste da Estatística Alfa de Cronbach: permitiu verificar se, em cada trio de variáveis (formados por amostras de pescado), o comportamento dos dados dos momentos de observação eram correlatos entre si;
- Teste de Cochran: permitiu verificar se, em cada trio de variáveis (formados por amostras de pescado), havia diferença entre essas três variáveis, quando comparadas concomitantemente;
- Análise de Correlação de Spearman: permitiu verificar o grau de relacionamento entre todos os pares de variáveis de interesse estudadas (escalares e categóricas).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção, “Resultados e Discussão”, está estruturada de forma a respeitar os mesmos itens descritos na seção “Material e Métodos”, quais sejam: Padronização; Análises Sensorial, Análises Microbiológicas e Físico-químicas; Teste do Cometa. As análises estatísticas estão distribuídas ao longo das seções

5.1 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DO COMETA

A tabela 2, abaixo, mostra a distribuição, em porcentagem de DNA, na cabeça e cauda do cometa e a sua respectiva classificação em tipo, variando de 1 a 5, encontrada nos filés de Tilápia e Salmão durante a padronização do Teste utilizando-se do Software CometScore®.

Tabela 2 - Distribuição do DNA e classificação na Padronização do Teste do Cometa por dia de análise dos filés de Tilápia e Salmão - São Paulo - 2013

Dia/Amostra	Tilápia			Salmão		
	%DNA Cabeça	%DNA Cauda	Tipo	%DNA Cabeça	%DNA Cauda	Tipo
Dia 00	63,72%	36,28%	3	60,07%	47,94%	3
Dia 01	84,70%	15,30%	2	87,48%	24,18%	1
Dia 02	79,33%	20,67%	2	91,56%	8,44%	1
Dia 03	60,25%	39,75%	3	86,37%	25,15%	2
Dia 04	60,20%	39,80%	3	53,92%	53,27%	3
Dia 05	65,74%	34,26%	3	51,41%	55,44%	3
Dia 06	65,42%	34,58%	3	66,55%	40,11%	3
Dia 07	70,92%	29,08%	3	93,86%	21,78%	1
Dia 08	59,58%	40,42%	3	89,92%	25,06%	1
Dia 09	47,87%	52,13%	3	95,13%	17,55%	1

Na figura 5 e 6 abaixo, as fotos identificadas de A a J apresentam os cometas característicos das lâminas de filé de Tilápia e Salmão, respectivamente, encontradas em cada dia de análise ao longo da etapa de Padronização do Teste do Cometa.

Figura 5 - Fotos dos cometas característicos do filé de Tilápia durante a Padronização do Teste do Cometa, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Legenda da figura 5: foto A = dia 0 (dia da produção); foto B = dia 1 pós-produção; foto C = dia 2 pós-produção; foto D = dia 3 pós-produção; foto E = dia 4 pós-produção; foto F = dia 5 pós-produção; foto G = dia 6 pós-produção; foto H = dia 7 pós-produção; foto I = dia 8 pós-produção; foto J = dia 9 pós-produção

Figura 6 - Fotos dos cometas característicos do filé de Salmão durante a Padronização do Teste do Cometa, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Legenda da figura 6: foto A = dia 0 (dia da produção); foto B = dia 1 pós-produção; foto C = dia 2 pós-produção; foto D = dia 3 pós-produção; foto E = dia 4 pós-produção; foto F = dia 5 pós-produção; foto G = dia 6 pós-produção; foto H = dia 7 pós-produção; foto I = dia 8 pós-produção; foto J = dia 9 pós-produção

A partir da foto H dos filés de Tilápia e da foto G dos filés de Salmão, após respectivamente seis e sete dias de armazenamento do pescado sob refrigeração, começou-se a observar o aumento da ocorrência de um artefato também fluorescente nas lâminas, isto é, pequenas formações arredondadas de dimensões muito inferiores às células do tecido em estudo, coradas à semelhança dos cometas formados pelas células de filés de Tilápia e de Salmão. Entendeu-se que esses artefatos poderiam interferir na classificação dos Cometas pelo Software CometScore®, pois este detecta e quantifica a fluorescência presente na lâmina, independentemente da origem.

As figuras 7 e 8 apresentam a classificação dos cometas a partir da leitura visual, em tipos de 1 até 5, de filés de tilápia, e de filés de Salmão, respectivamente.

Figura 7 - Classificação visual dos cometas do filé de Tilápia na padronização do Teste do Cometa, aumento de 400X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Legenda da figura 7: foto A = cometa tipo 1, foto B = cometa tipo 2, foto C = cometa tipo 3, foto D = cometa tipo 4, foto E = cometa tipo 5.

Figura 8 - Classificação visual dos cometas do filé de Salmão na padronização do Teste do Cometa, aumento de 400X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Legenda da figura 8: foto A = cometa tipo 1, foto B = cometa tipo 2, foto C = cometa tipo 3, foto D = cometa tipo 4, foto E = cometa tipo 5.

As figuras 9 e 10 mostram as imagens encontradas na cultura de *E. coli* em temperatura de refrigeração nas concentrações 1 e 10 da escala de McFarland, respectivamente. As figuras 11 e 12 mostram as imagens encontradas na cultura de *E. coli* em temperatura ambiente nas concentrações 1 e 10 da Escala de McFarland, respectivamente.

Figura 9 - Solução de *E. coli* mantida em temperatura de 0° a 5° C na concentração 1 da escala de McFarland, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Figura 10 - Solução de *E. coli* mantida em temperatura de 0° a 5° C na concentração 10 da escala de McFarland, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Figura 11 - Solução de *E. coli* mantida em temperatura de 20° a 25° C na concentração 1 da escala de McFarland, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Figura 12 - Solução de *E. coli* mantida em temperatura de 20° a 25° C na concentração 10 da escala de McFarland, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

A figura 13 mostra mais artefatos encontrados no filé de Tilápia, enquanto a figura 14 mostra os artefatos encontrados no filé de Salmão.

Figura 13 - Artefatos encontrados nas lâminas preparadas a partir do filé de Tilápia na padronização do Teste do Cometa, no 9º dia de análise, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Figura 14 - Artefatos encontrados nas lâminas preparadas a partir do filé de Salmão na padronização do Teste do Cometa, no 9º dia de análise, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Considerando a intensa semelhança encontrada entre os artefatos visualizados nas lâminas de filés de tilápia e de Salmão e as lâminas com a cultura de *E. coli* e considerando o aumento gradual dessa presença nas lâminas observadas ao longo da Padronização do Teste do Cometa, concluiu-se que tais artefatos são bactérias que foram proliferando ao longo da vida útil do produto mantido sob refrigeração até o término do estudo. Fato semelhante foi encontrado por Cerda e Koppen (1998), que analisaram amostras de musculatura de frango armazenado por 12 dias, entre 2 e 4°C. Os autores observaram que com o passar do tempo, formava-se um padrão gradual ao fundo das lâminas avaliadas condizente com o aumento bacteriano da microbiota existente nas amostras.

Como o aumento da quantidade de artefatos pode causar interferência na leitura das lâminas pelo Software CometScore®, foi decidido que as lâminas que seriam produzidas para o Teste do Cometa passariam não só pela avaliação do CometScore®, mas também por uma avaliação e classificação visual do autor, de forma que o excesso de fluorescência no fundo da lâmina não fosse considerado, na leitura e classificação dos cometas. A proposta foi a seguinte: dispondo de duas formas diferentes de classificá-los, possibilitar um critério a mais de verificação da eficiência e eficácia do Software convencionado de leitura.

5. 2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Seguem as tabelas 3, 4 e 5 com os resultados das Análises Físico-químicas de cada dia de análise por Momento.

Tabela 3 - Resultados dos parâmetros físico-químicos do Primeiro Momento em cada dia de análise - São Paulo - 2013

Momento	DIA	Amostra	Bases voláteis totais (mg/100g)					pH							Trimetilamina (mg/100g)				
			1	2	3	Média	Desv Pad	1	2	3	4	5	Média	Desv Pad	1	2	3	Média	Desv Pad
1º Momento	Análise Dia 0	A	6,09	6,34	6,09	6,17	0,14	6,13	6,11	6,08	6,1	6,1	6,10	0,02	0,98	0,53	0	0,50	0,49
		B	13,62	9,73	11,19	11,51	1,97	6,04	6	5,92	6,1	6,05	6,02	0,07	9,5	7,92	9,5	8,97	0,91
		C	8,78	9,27	9,27	9,11	0,28	5,92	6,07	5,94	6,14	6,15	6,04	0,11	4,23	2,65	5,29	4,06	1,33
	Análise Dia 5	A	9,25	8,52	8,77	8,85	0,37	6	6	6,01	6,07	6,16	6,05	0,07	9,25	8,52	8,77	8,85	0,37
		B	12,67	10,96	12,18	11,94	0,88	6,13	6,1	6,16	6,11	6,11	6,12	0,02	7,8	6,09	7,31	7,07	0,88
		C	12,16	10,7	10,94	11,27	0,78	6,16	6	6,16	6,02	6,09	6,09	0,08	7,3	7,78	7,3	7,46	0,28
	Análise Dia 9	A	17,56	18,04	17,56	17,72	0,28	6,13	6,2	6,1	6,06	6,13	6,12	0,05	12,68	15,12	13,65	13,82	1,23
		B	16,85	17,09	17,09	17,01	0,14	6,36	6,13	6,01	6	6,02	6,10	0,15	14,65	14,65	15,63	14,98	0,57
		C	13,9	14,63	14,14	14,22	0,37	6,14	6,15	6	6,2	6	6,10	0,09	11,22	11,46	11,71	11,46	0,25
	Análise Dia 12	A	24,86	24,86	24,61	24,78	0,14	6,32	6,32	6,18	6,18	6,33	6,27	0,08	13,89	15,6	14,87	14,79	0,86
		B	30,59	29,62	29,62	29,94	0,56	6,37	6,25	6,3	6,26	6,2	6,28	0,06	13,84	11,65	14,08	13,19	1,34
		C	26,77	27,74	28,23	27,58	0,74	6,2	6,13	6,09	6,16	6,18	6,15	0,04	16,06	17,03	18,01	17,03	0,98
	Análise Dia 14	A	33,3	33,81	34,82	33,98	0,77	5,89	6,1	5,98	6,15	5,95	6,01	0,11	24,22	21,19	20,18	21,86	2,10
		B	29,95	30,2	30,45	30,20	0,25	6,16	6,26	6,14	6,18	6,17	6,18	0,05	10,07	15,1	12,58	12,58	2,52
		C	32,57	31,31	31,31	31,73	0,73	6,21	6,05	5,99	6,17	5,99	6,08	0,10	13,63	11,61	11,61	12,28	1,17

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros físico-químicos do Segundo Momento em cada dia de análise - São Paulo - 2013

Momento	DIA	Amostra	Bases voláteis totais (mg/100g)					pH							Trimetilamina (mg/100g)				
			1	2	3	Média	Desv Pad	1	2	3	4	5	Média	Desv Pad	1	2	3	Média	Desv Pad
2º Momento	Análise Dia 0	A	11,62	12,63	12,63	12,29	0,58	6,03	6	6,03	5,96	6	6,00	0,03	1,01	1,52	3,03	1,85	1,05
		B	15,12	15,12	14,12	14,79	0,58	5,89	5,96	6,04	5,99	5,93	5,96	0,06	5,8	4,54	5,04	5,13	0,63
		C	11,6	11,09	11,09	11,26	0,29	6,03	6,02	6,01	6,08	5,99	6,03	0,03	0	0	0	0,00	0,00
	Análise Dia 5	A	11,63	11,13	11,63	11,46	0,29	6	6,09	6	6,1	6,1	6,06	0,05	2,02	2,53	1,52	2,02	0,51
		B	15,26	17,89	16,84	16,66	1,32	6,05	6,09	6,07	6,06	6,05	6,06	0,02	7,89	7,37	7,89	7,72	0,30
		C	12,6	11,55	11,02	11,72	0,80	6,06	6,05	6,02	6,07	6,09	6,06	0,03	2,62	1,05	1,57	1,75	0,80
	Análise Dia 9	A	28,84	27,83	27,07	27,91	0,89	6,11	6,26	6,15	6,14	6,34	6,20	0,10	21,25	22,77	23,28	22,43	1,06
		B	31,32	28,79	29,8	29,97	1,27	6,13	6,03	6,24	6,28	6,45	6,23	0,16	23,24	20,71	21,72	21,89	1,27
		C	28,98	28,98	27,4	28,45	0,91	6,11	6,03	6,08	5,98	6,02	6,04	0,05	17,17	16,34	15,28	16,26	0,95
	Análise Dia 12	A	39,54	39,01	41,12	39,89	1,10	5,9	5,92	5,87	5,91	6,07	5,93	0,08	25,83	24,78	25,3	25,30	0,53
		B	35,89	35,89	35,39	35,72	0,29	6,09	6,29	6,6	6,27	5,98	6,25	0,24	25,28	24,77	23,76	24,60	0,77
		C	35,44	34,43	33,93	34,60	0,77	6,32	5,95	5,93	6,03	6,57	6,16	0,28	22,79	21,27	20,25	21,44	1,28
	Análise Dia 14	A	35,57	34,26	34,78	34,87	0,66	6,01	6,27	6,47	6,85	5,95	6,31	0,37	22,13	22,66	20,03	21,61	1,39
		B	33,46	32,67	34,25	33,46	0,79	6	6,07	6,75	6,43	6,6	6,37	0,33	20,02	20,55	20,55	20,37	0,31
		C	37,39	36,64	35,88	36,64	0,76	6,26	6,23	6,4	6,53	6,01	6,29	0,20	19,2	20,21	20,47	19,96	0,67

Tabela 5 - Resultados dos parâmetros físico-químicos do Terceiro Momento em cada dia de análise - São Paulo - 2013

Momento	DIA	Amostra	Bases voláteis totais (mg/100g)					pH							Trimetilamina (mg/100g)				
			1	2	3	Média	Desv Pad	1	2	3	4	5	Média	Desv Pad	1	2	3	Média	Desv Pad
3º Momento	Análise Dia 0	A	0,52	1,04	1,04	0,87	0,30	6,05	5,99	6,07	5,96	5,92	6,00	0,06	-	-	-	-	-
		B	2,12	2,12	2,65	2,30	0,31	5,92	5,91	6	6,01	5,95	5,96	0,05	-	-	-	-	-
		C	1,59	1,59	2,12	1,77	0,31	5,88	5,91	5,91	5,93	5,85	5,90	0,03	-	-	-	-	-
	Análise Dia 5	A	6,89	7,95	6,89	7,24	0,61	6,06	6,09	6,03	5,84	6,19	6,04	0,13	0,53	1,06	1,06	0,88	0,31
		B	13,23	10,59	15,35	13,06	2,38	6,03	6,02	6	6,01	6,06	6,02	0,02	2,12	5,82	6,35	4,76	2,30
		C	7,41	6,35	10,06	7,94	1,91	5,99	6,13	6	6,01	6,01	6,03	0,06	3,18	2,12	4,76	3,35	1,33
	Análise Dia 9	A	24,9	27,02	23,84	25,25	1,62	6,08	6	6,13	6,13	6,2	6,11	0,07	14,84	15,9	12,72	14,49	1,62
		B	13,26	16,41	15,35	15,01	1,60	6,02	5,97	6,03	6,14	5,93	6,02	0,08	7,41	10,59	9	9,00	1,59
		C	29,08	29,61	32,26	30,32	1,70	6,17	6,07	6,04	6,02	6,05	6,07	0,06	20,62	21,15	22,74	21,50	1,10
	Análise Dia 12	A	39,2	38,67	39,99	39,29	0,66	5,78	5,86	6,62	6,32	5,79	6,07	0,38	29,66	29,13	30,19	29,66	0,53
		B	32,27	32,8	33,33	32,80	0,53	5,92	6,15	5,88	5,87	6,27	6,02	0,18	22,75	21,96	22,22	22,31	0,40
		C	31,19	29,6	32,25	31,01	1,33	6,21	6,08	6,06	5,92	6,13	6,08	0,11	29,07	26,43	30,13	28,54	1,91
	Análise Dia 14	A	34,48	36,07	31,56	34,04	2,29	5,72	6,05	5,87	5,8	5,77	5,84	0,13	18,56	19,1	19,63	19,10	0,54
		B	34,18	34,18	33,39	33,92	0,46	5,78	5,79	6,04	6,2	5,83	5,93	0,19	24,38	21,2	23,05	22,88	1,60
		C	34,11	32,26	33,32	33,23	0,93	6,2	6,2	6,2	6,24	6,15	6,20	0,03	29,09	26,44	30,14	28,56	1,91

No dia zero, fez-se a caracterização do produto, de acordo com os padrões vigentes (Brasil, 1952; UE, 1991). Os padrões estabelecidos são: N-BVT = < 30 mg/100g, pH = < 6,9, e TMA = < 12 mg/100g.

Nas amostras analisadas durante este estudo, o pH foi o parâmetro mais constante em termos de resultados, com pequenas variações entre os dias de análises, sendo que nenhuma amostra foi considerada imprópria perante a legislação.

Os valores de N-BVT variaram entre 0,86 e 39,89 mg/100g de amostra. A partir do 12º dia de análise, seis das nove amostras foram consideradas impróprias. Este resultado foi considerado dentro do esperado, uma vez que o frigorífico estabelece a vida útil ao produto de até 10 dias a partir da produção, desde que mantido sob temperatura e condições de armazenamento adequadas.

Com relação à TMA, os resultados obtidos variaram entre 0,50 e 28,55 mg/100g de amostra, sendo que sete das nove amostras foram consideradas impróprias a partir do 9º dia, isto é, um dia antes do período de validade estabelecido.

No trabalho de Albuquerque, Zapata e Almeida (2004), comparando tilápias insensibilizadas com gelo e com dióxido de carbono, os valores de pH também não apresentaram grande variação, independentemente do grupo avaliado durante os 18 dias do experimento. Porém, os valores de N-BVT também se apresentaram estáveis durante o tempo de vida útil, variando de 18,38 a 21,40 mg/100g de amostra, desde o primeiro dia, após o abate, até o 18º dia da análise.

Já Chytiri et al. (2004) encontraram valores crescentes de N-BVT durante o tempo de vida útil de lotes de Trutas Arco-íris (*Onchorynchus mykiss*) filetadas ou só evisceradas e mantidas em gelo. Mesmo sem atingir o limite máximo permitido para o parâmetro, durante os 18 dias de experimento, os valores de N-BVT para o grupo eviscerado variou entre 14,11 e 20,16 mg/100g de amostra enquanto que para o grupo filetado variou de 18,11 a 26,06 mg/100g. Estes resultados sugerem

a hipótese de que a manipulação e o processamento para a produção dos filés contribuam para a ocorrência das reações físico-químicas, incrementando os resultados das análises de bases voláteis. Talvez a exposição de superfície de contato dos tecidos às contaminações do ambiente, a realização de cortes, o contato com superfícies e mãos dos manipuladores, também contribuam com os processos de deterioração e autólise.

Ainda, Chytiri et al. (2004), nas mesmas amostras, estudando TMA, encontraram valores entre 1,14 a 4,29 mg/100g no grupo eviscerado e entre 1,11 a 6,38 mg/100g no grupo filetado, indicando pouca quantidade do precursor Óxido de Trimetilamina para a formação da Trimetilamina em Truta Arco-Íris. Porém, a análise de TMA é um fraco indicador de frescor para Truta Arco-Íris, como afirmado por Ababouch et al. (1996), que aponta que a quantidade do precursor de TMA varia muito para cada espécie de pescado, não contribuindo para análises de frescor em qualquer tipo de pescado.

5. 3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os resultados das Análises Microbiológicas de cada dia de análise do 1º ao 3º momento de estudo estão apresentados nas tabelas 6, 7 e 8. Como descrito anteriormente, a primeira análise relacionou os padrões oficiais para o produto, e foi denominada “Padrão do Produto” (BRASIL, 1978; ANVISA, 2001), enquanto que as subseqüentes correspondiam às análises relativas aos vários dias de estudo, em cada um dos momentos estabelecidos.

Tabela 6 - Contagens bacterianas do Primeiro Momento de cada amostra por dia de análise - São Paulo - 2013

Dias	Microrganismos	1º Momento		
		Amostra A	Amostra B	Amostra C
Análise Padrão do Produto	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$2,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$1,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$5,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$1,0 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
	*Clostrídios Sulfito Redutores (UFC/g)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$
	**Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$
	* <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
	*** <i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	Ausente	Ausente	Ausente
Análise Dia 5	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$2,0 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$5,9 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$5,3 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$2,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$8,4 \times 10^7$
Análise Dia 9	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$6,8 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$5,1 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$	$6,3 \times 10^8$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$1,3 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$6,5 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
Análise Dia 12	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$1,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$3,2 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$8,6 \times 10^7$	$9,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$
Análise Dia 14	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$9,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	-	-	-
	*Enterobactérias (UFC/g)	$2,7 \times 10^7$	$6,4 \times 10^8$	$4,4 \times 10^7$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$8,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	$1,7 \times 10^9$

Legenda da tabela 6: * = contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFC por grama de amostra; ** = contagem pelo Número Mais Provável - NMP por grama de amostra; *** = pesquisa de presença ou ausência em 25 gramas da amostra; - = ausência de resultados para o microrganismo indicado.

Tabela 7 - Contagens bacterianas do Segundo Momento de cada amostra por dia de análise - São Paulo - 2013

Dias	Microrganismos	2º Momento		
		Amostra A	Amostra B	Amostra C
Análise Padrão do Produto	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$2,5 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$9,8 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$4,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$8,7 \times 10^5$
	*Clostrídios Sulfito Redutores (UFC/g)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$
	**Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$
	* <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
	*** <i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	Ausente	Ausente	Ausente
Análise Dia 5	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$2,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$9,7 \times 10^8$	$8,7 \times 10^7$	$4,8 \times 10^8$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$2,8 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$3,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
Análise Dia 9	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$2,7 \times 10^8$	$6,7 \times 10^8$	$4,4 \times 10^9$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$4,4 \times 10^9$	$4,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$1,8 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$7,9 \times 10^7$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$1,0 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$
Análise Dia 12	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$5,0 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$7,4 \times 10^7$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$5,6 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$2,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$2,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$
Análise Dia 14	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$4,0 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$5,1 \times 10^9$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$2,8 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^9$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$3,9 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$3,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$

Legenda da tabela 7: * = contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFC por grama de amostra; ** = contagem pelo Número Mais Provável - NMP por grama de amostra; *** = pesquisa de presença ou ausência em 25 gramas da amostra.

Tabela 8 - Contagens bacterianas do Terceiro Momento de cada amostra por dia de análise - São Paulo - 2013

Dias	Microrganismos	3º Momento		
		Amostra A	Amostra B	Amostra C
Análise Padrão do Produto	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$8,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$7,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$2,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$7,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
	*Clostrídios Sulfito Redutores (UFC/g)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$
	**Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$
	* <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
	*** <i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	Ausente	Ausente	Ausente
Análise Dia 5	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$4,6 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	$7,9 \times 10^7$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$2,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$7,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$2,9 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
Análise Dia 9	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$3,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$2,8 \times 10^9$	$8,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$1,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$1,2 \times 10^9$	$6,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$
Análise Dia 12	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$3,4 \times 10^8$	$9,5 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$1,0 \times 10^9$	$5,7 \times 10^8$	$5,1 \times 10^9$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$6,8 \times 10^6$	$8,1 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
Análise Dia 14	*Aeróbios Mesófilos Totais (UFC/g)	$2,7 \times 10^9$	$7,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
	*Microrganismos Aeróbios Psicrotróficos (UFC/g)	$6,7 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$
	*Enterobactérias (UFC/g)	$7,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$
	* <i>Pseudomonas</i> spp (UFC/g)	$6,7 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$4,3 \times 10^9$

Legenda da tabela 8: * = contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFC por grama de amostra; ** = contagem pelo Número Mais Provável - NMP por grama de amostra; *** = pesquisa de presença ou ausência em 25 gramas da amostra.

Os limites legais para os parâmetros de qualidade sanitária do produto são: *Salmonella spp* = ausência em 25g, *Staphylococcus aureus* = $< 10^3$ UFC/g, Clostrídios Sulfito Redutores = $< 2 \times 10$ UFC/g, e Coliformes Termotolerantes = $< 10^2$ NMP/g. Todas as amostras utilizadas neste estudo se apresentaram dentro dos padrões, sendo produto apto para comercialização e consumo no mercado interno nacional. A partir dessa constatação, o estudo teve sua continuidade.

Com relação aos parâmetros indicadores das condições higiênicas do produto, tem-se como padrão para Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Mesófilos Totais valores inferiores a 3×10^6 UFC/g (SÃO PAULO, 1978). Não existe padrão para Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Psicrotróficos, porém, muitos desses microrganismos também se multiplicam na faixa de temperatura mesófila. Assim, decidiu-se manter o mesmo padrão limite de $< 3 \times 10^6$ UFC/g para os Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Psicrotróficos.

Não foram encontrados padrões estabelecidos para contagem de Enterobactérias nem para *Pseudomonas spp*. Também não foram encontradas especificações, na literatura sobre o tema e, não sendo possível arbitrar um limite para julgar o produto próprio e impróprio, com relação a esses dois parâmetros. Desta forma, não foi possível a utilização de testes estatísticos a partir dos dados obtidos.

Mesmo assim, somente com os Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Mesófilos Totais e Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Psicrotróficos foi possível observar que a partir do 5º dia de análise, quase todas as amostras já se encontraram impróprias para o consumo, indicando uma alta carga microbiana de deteriorantes nos produtos. Duas hipóteses, não excludentes, podem ser sugeridas para explicar tal resultado: 1) há necessidade de melhorar as condições de higiene geral de produção dos filés de Tilápia e/ou 2) a conservação dos filés sob temperaturas entre zero e $+5^\circ\text{C}$ oferece condições favoráveis aos processos de deterioração e autólise, o que poderia ser reduzido se fosse estabelecido pelo fabricante conservação sob temperaturas inferiores, como por exemplo, entre -1 e $+1^\circ\text{C}$ (VIEIRA, 2004).

Diversas etapas do processamento desse produto podem ter influenciado para o resultado de altas cargas de microrganismos deteriorantes; uma vez que a somatória das condições higiênicas das instalações, do estabelecimento produtor, da higiene de mãos e equipamentos, da qualidade de água utilizada na empresa, e do tempo e temperatura do ambiente e do produto durante a manipulação definem o perfil higiênico final do produto, como conceituado por Vieira et al. (2000) e Santos (2006).

Ao avaliar grupos de tilápias criadas com suplemento alimentar em cativeiro, Eves et al. (1995) analisaram a qualidade microbiológica da água de cultivo e dos peixes recém despescados e mantidos em gelo, na proporção 1:1, durante 21 dias. Os autores também não detectaram a presença de *Salmonella* spp nos peixes, após a despesca. O pescado foi considerado deteriorado e impróprio para consumo após 18 dias de estocagem em gelo, obtendo-se na Contagem Padrão em Placa de Microrganismos Aeróbios Estritos e Facultativos Viáveis Mesófilos, unidades formadoras de colônia, da ordem de 10^6 a 10^8 por grama de amostra. Neste estudo, os filés contendo 3×10^6 UFC/g de microrganismos mesófilos também foi considerado impróprio, porém após cinco dias de vida útil e mantido a temperaturas entre zero e 5°C. É possível que as condições higiênicas de produção dos filés deste experimento não atingiram o grau de excelência das condições de produção dos peixes estudados por Eves et al. (1995), porém consideração deve ser feita ao fato de que no estudo citado, o pescado foi mantido em gelo, situação que sabidamente a temperatura do pescado varia entre -1 a +1°C, condições que dificultam tanto a ação microbiana quanto os processos enzimáticos, que ocorrerão porém com maior lentidão, no decorrer dos dias, quando comparados a um produto (por exemplo os filés de Tilápia deste estudo) mantidos entre 0 e +5°C.

Chytiri et al. (2004) também avaliaram parâmetros microbiológicos em amostras dos grupos de Truta Arco-íris evisceradas e filetados conservados em gelo e refrigerados à 2°C, encontrando após 10 dias de armazenamento para os filés, e 18 dias para o peixe eviscerado, contagens de microrganismos mesófilos, da ordem de 10^6 UFC/g de amostra, sendo considerados impróprios pela

legislação. A contagem de *Pseudomonas* spp também atingiu, após 10 dias, o valor de 10^6 UFC/g para os filés de Truta Arco-íris, coincidindo com o julgamento impróprio dos microrganismos mesófilos. O estudo de Chytiri et al. (2004) e o presente, servem de subsídios, que somados a de outros trabalhos que serão realizados permitirão definir limites críticos para determinados agentes, como *Pseudomonas* spp, já que este microrganismo é encontrado em grande quantidade e representa o mais importante gênero para deterioração de Pescado (SURENDRAN et al., 1989).

As contagens de Enterobactérias atingiram valores mais baixos, da ordem de 10^5 UFC/g durante os 18 dias do experimento de Chytiri et al. (2004). Entende-se que era esperado menor concentração de Enterobactérias, por exemplo, em relação à *Pseudomonas* spp, agente característico em carnes *in natura* mantidas refrigerados. O fato das contagens de Enterobactérias deste trabalho ser muito maior do que os valores encontrados por Chytiri et al. (2004) pode ser explicado pelas diferenças de situação de cada um dos estabelecimentos processadores de pescado, evidenciando realidades distintas quanto à higiene e BPF.

Além das realidades distintas de higiene e BPF que podem ser encontradas, diferenças de processamento, temperatura e até mesmo tempos pós-despesca podem apresentar resultados contrastantes quando avaliados. Neste trabalho, somente foram utilizados outros autores que abordassem parâmetros iguais ou semelhantes aos estudados e possuísem uma realidade de processamento e experimental compatível a realidade estudada, evitando disparidades nos dados discutidos.

5.4 ANÁLISES SENSORIAIS

As tabelas 9, 10, 11 e 12 abaixo mostram os resultados do Teste de Aceitabilidade, tomando como categoria de avaliação a Intenção de Compra, o Odor, a Textura e a Aparência dos filés, respectivamente.

Tabela 9 - Análise Sensorial por Intenção de Compra, em cada um dos momentos de estudo, nos diferentes dias de análises - São Paulo - 2013

Intenção de Compra						
Momento / Dia		5 - Certamente compraria	4 - Provavelmente compraria	3 - Talvez compraria	2 - Provavelmente não compraria	1 - Certamente não compraria
1º Momento	Análise Dia 0	93,30%	6,70%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	60,00%	33,30%	6,70%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	10,00%	40,00%	20,00%	23,30%	6,70%
	Análise Dia 12	3,30%	13,30%	26,70%	26,70%	30,00%
	Análise Dia 14	3,30%	0,00%	20,00%	26,70%	50,00%
2º Momento	Análise Dia 0	56,70%	26,70%	10,00%	6,70%	0,00%
	Análise Dia 5	33,30%	40,00%	20,00%	6,70%	0,00%
	Análise Dia 9	6,70%	26,70%	10,00%	30,00%	26,70%
	Análise Dia 12	0,00%	6,70%	13,30%	23,30%	56,70%
	Análise Dia 14	3,30%	6,70%	16,70%	6,70%	66,70%
3º Momento	Análise Dia 0	90,00%	6,70%	0,00%	3,30%	0,00%
	Análise Dia 5	33,30%	30,00%	33,30%	0,00%	3,30%
	Análise Dia 9	6,70%	6,70%	16,70%	40,00%	30,00%
	Análise Dia 12	3,30%	10,00%	10,00%	26,70%	50,00%
	Análise Dia 14	0,00%	0,00%	6,70%	23,30%	70,00%

Tabela 10 - Análise Sensorial por Odor nos momentos e dias de análise - São Paulo - 2013

Característica Sensorial: ODOR										
Momento / Dia		9 - Gostei muitíssimo	8 - Gostei muito	7 - Gostei moderadamente	6 - Gostei ligeiramente	5 - Nem gostei / nem desgostei	4 - Desgostei ligeiramente	3 - Desgostei moderadamente	2 - Desgostei muito	1 - Desgostei MUITÍSSIMO
1º Momento	Análise Dia 0	40,00%	43,30%	13,30%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	16,70%	40,00%	26,70%	16,70%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	3,30%	13,30%	40,00%	6,70%	6,70%	13,30%	3,30%	10,00%	3,30%
	Análise Dia 12	3,30%	3,30%	16,70%	10,00%	6,70%	6,70%	10,00%	36,70%	6,70%
	Análise Dia 14	0,00%	3,30%	6,70%	6,70%	0,00%	6,70%	10,00%	26,70%	40,00%
2º Momento	Análise Dia 0	16,70%	43,30%	20,00%	10,00%	3,30%	3,30%	3,30%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	6,70%	43,30%	23,30%	20,00%	0,00%	6,70%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	0,00%	13,30%	20,00%	3,30%	3,30%	6,70%	13,30%	33,30%	6,70%
	Análise Dia 12	0,00%	3,30%	6,70%	6,70%	3,30%	10,00%	6,70%	33,30%	30,00%
	Análise Dia 14	3,30%	3,30%	13,30%	3,30%	3,30%	10,00%	3,30%	16,70%	43,30%
3º Momento	Análise Dia 0	23,30%	63,30%	6,70%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%	3,30%	0,00%
	Análise Dia 5	0,00%	46,70%	20,00%	20,00%	3,30%	6,70%	0,00%	3,30%	0,00%
	Análise Dia 9	0,00%	6,70%	10,00%	3,30%	3,30%	26,70%	10,00%	30,00%	10,00%
	Análise Dia 12	0,00%	3,30%	13,30%	0,00%	3,30%	10,00%	10,00%	33,30%	26,70%
	Análise Dia 14	0,00%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%	6,70%	23,30%	26,70%	40,00%

Tabela 11 - Análise Sensorial por Aparência nos momentos e dias de análise - São Paulo - 2013

Característica Sensorial: APARÊNCIA										
Momento / Dia		9 - Gostei muitíssimo	8 - Gostei muito	7 - Gostei moderadamente	6 - Gostei ligeiramente	5 - Nem gostei / nem desgostei	4 - Desgostei ligeiramente	3 - Desgostei moderadamente	2 - Desgostei muito	1 - Desgostei MUITÍSSIMO
1º Momento	Análise Dia 0	36,70%	63,30%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	20,00%	50,00%	26,70%	0,00%	0,00%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	3,30%	36,70%	23,30%	20,00%	6,70%	3,30%	3,30%	3,30%	0,00%
	Análise Dia 12	0,00%	13,30%	26,70%	33,30%	10,00%	3,30%	10,00%	3,30%	0,00%
	Análise Dia 14	0,00%	13,30%	10,00%	13,30%	10,00%	20,00%	10,00%	23,30%	0,00%
2º Momento	Análise Dia 0	13,30%	56,70%	16,70%	6,70%	0,00%	6,70%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	10,00%	36,70%	40,00%	6,70%	3,30%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	6,70%	23,30%	20,00%	6,70%	0,00%	23,30%	6,70%	13,30%	0,00%
	Análise Dia 12	0,00%	13,30%	13,30%	3,30%	6,70%	3,30%	16,70%	33,30%	10,00%
	Análise Dia 14	6,70%	10,00%	13,30%	10,00%	0,00%	13,30%	6,70%	20,00%	20,00%
3º Momento	Análise Dia 0	30,00%	63,30%	6,70%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	6,70%	53,30%	23,30%	6,70%	3,30%	3,30%	0,00%	3,30%	0,00%
	Análise Dia 9	3,30%	10,00%	16,70%	10,00%	6,70%	10,00%	23,30%	16,70%	3,30%
	Análise Dia 12	0,00%	10,00%	16,70%	20,00%	0,00%	6,70%	23,30%	10,00%	13,30%
	Análise Dia 14	0,00%	3,30%	10,00%	3,30%	10,00%	10,00%	33,30%	30,00%	0,00%

Tabela 12 - Análise Sensorial por Textura nos momentos e dias de análise - São Paulo - 2013

Característica Sensorial: TEXTURA										
Momento / Dia		9 - Gostei muitíssimo	8 - Gostei muito	7 - Gostei moderadamente	6 - Gostei ligeiramente	5 - Nem gostei / nem desgostei	4 - Desgostei ligeiramente	3 - Desgostei moderadamente	2 - Desgostei muito	1 - Desgostei MUITÍSSIMO
1º Momento	Análise Dia 0	36,70%	60,00%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	13,30%	60,00%	20,00%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	10,00%	23,30%	30,00%	16,70%	0,00%	13,30%	6,70%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 12	0,00%	16,70%	23,30%	10,00%	16,70%	23,30%	3,30%	3,30%	3,30%
	Análise Dia 14	0,00%	10,00%	13,30%	20,00%	6,70%	10,00%	6,70%	23,30%	10,00%
2º Momento	Análise Dia 0	20,00%	63,30%	13,30%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	0,00%	56,70%	30,00%	6,70%	3,30%	3,30%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	6,70%	30,00%	6,70%	13,30%	10,00%	16,70%	6,70%	10,00%	0,00%
	Análise Dia 12	0,00%	0,00%	26,70%	6,70%	6,70%	16,70%	16,70%	20,00%	6,70%
	Análise Dia 14	3,30%	10,00%	16,70%	6,70%	6,70%	16,70%	10,00%	16,70%	13,30%
3º Momento	Análise Dia 0	40,00%	50,00%	10,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 5	6,70%	53,50%	30,00%	10,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Análise Dia 9	3,30%	20,00%	6,70%	13,30%	20,00%	10,00%	10,00%	13,30%	3,30%
	Análise Dia 12	0,00%	13,30%	6,70%	20,00%	0,00%	20,00%	13,30%	16,70%	10,00%
	Análise Dia 14	0,00%	3,30%	6,70%	16,70%	0,00%	16,70%	20,00%	33,30%	3,30%

Não existem na legislação, limites legais para parâmetros em provas sensoriais, já que a avaliação sensorial depende de vários fatores como hábitos de consumo, convenções sociais e características específicas da cultura de um determinado povo, região e grupo social (SOARES, 2007). Porém, seguindo a conduta convencionada nas provas e estudos com análises sensoriais realizadas no CTC/ITAL e de acordo com pesquisas sensoriais (STONE; SIDEL, 2004), adotou-se que a partir de 50% ou mais dos consumidores pontuarem o produto em análise como “neutro” ou “negativo”, este será considerado inaceitável ou impróprio para consumo.

Utilizando-se dessa metodologia para a interpretação de dados, temos que todas as provas sensoriais apresentaram o mesmo padrão de comportamento nos resultados apresentados, isto é, a partir do 9º dia de análise, pelo menos uma amostra em todos os parâmetros sensoriais já apresentava condições impróprias para consumo, e a partir do 12º dia, todas as amostras apresentavam condições impróprias para consumo em todos os parâmetros estudados. Constatou-se que a categoria de análise “Intenção de Compra” representou uma síntese dos demais parâmetros utilizados na análise sensorial, isto é, a sua interpretação parece sinalizar de forma única, a percepção dos consumidores em cada um dos parâmetros utilizados.

Eves et al. (1995) também analisaram sensorialmente as Tilápias armazenadas em gelo imediatamente após despesca, na proporção 1:1, por 21 dias. Para os parâmetros de Odor e Sabor, não foram encontradas grandes variações, somente próximo aos 21 dias de experimento houve uma queda significativa de aceitação e os parâmetros de Aparência e Textura praticamente não sofreram variações registráveis durante o estudo. Já com relação à Aceitabilidade Geral encontraram variações nas respostas dos avaliadores, que apontaram significativa redução da aceitação a partir do 11º dia de conservação no gelo pós-despesca.

Chytiri et al. (2004) estudaram o frescor de trutas evisceradas, conservada em gelo após despesca, por 18 dias. Foram estudados os parâmetros de frescor do Pescado através da Aparência, Odor e Textura, por um grupo treinado de avaliadores; e os resultados foram compilados como um parâmetro só que

indicasse Aceitabilidade Geral do produto. O produto se manteve com boa aceitação até o nono dia pós-despesca; e após 12 dias já eram identificados aspectos de perda de frescor. No 15º dia pós-despesca, as amostras foram consideradas inaceitáveis pelos avaliadores.

5.5 TESTE DO COMETA

A tabela 13 abaixo mostra a distribuição de concentração de DNA em porcentagem (%) e por classificação do tipo de Cometa encontrada durante a leitura utilizando o Software CometScore® e a observação Visual do autor.

Tabela 13 – Distribuição, em porcentagens (%) dos tipos de Cometa observados em filés de Tilápia, refrigeradas, nos diferentes dias de análise, para cada um dos momentos do estudo - São Paulo – 2013

Momentos	Tipo de Cometa	Análise Dia 00		Análise Dia 05		Análise Dia 09		Análise Dia 12		Análise Dia 14	
		CometScore®	Visual	CometScore®	Visual	CometScore®	Visual	CometScore®	Visual	CometScore®	Visual
1º Momento	1	9,43%	14,86%	2,94%	9,35%	-	-	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	2	15,72%	33,11%	1,96%	23,36%	-	-	3,23%	0,00%	0,00%	0,00%
	3	61,01%	33,78%	50,00%	38,32%	-	-	9,68%	7,84%	26,51%	5,10%
	4	10,69%	12,16%	33,33%	17,76%	-	-	38,71%	17,65%	46,99%	8,92%
	5	3,14%	6,08%	11,76%	11,21%	-	-	48,39%	74,51%	26,51%	85,99%
2º Momento	1	1,94%	7,88%	5,67%	1,85%	0,62%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	2	7,10%	51,52%	7,09%	23,46%	3,09%	5,56%	0,65%	0,00%	0,00%	0,00%
	3	58,71%	25,45%	62,41%	22,84%	35,19%	19,14%	1,95%	5,03%	0,00%	0,97%
	4	24,52%	5,45%	17,73%	14,81%	30,25%	31,48%	30,52%	13,21%	22,77%	14,56%
	5	7,74%	9,70%	7,09%	37,04%	30,86%	43,83%	66,88%	81,76%	77,23%	84,47%
3º Momento	1	0,00%	3,66%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	2	3,05%	34,15%	35,58%	35,58%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	3	40,24%	32,32%	30,67%	30,67%	0,97%	3,00%	0,00%	0,00%	0,71%	0,00%
	4	32,32%	14,63%	17,18%	17,18%	39,81%	15,00%	28,28%	3,47%	31,21%	0,00%
	5	24,39%	15,24%	16,56%	16,56%	59,22%	82,00%	71,72%	96,53%	68,09%	100,00%

Legenda da tabela 13: - = perda de resultados por falha técnica.

A figura 15 abaixo mostra cometas do Tipo 1 a 5 do filé de Tilápia obtidos durante a realização do estudo, enquanto que a figura 16, na sequência, mostra artefatos da técnica encontrados durante a realização do Teste do Cometa.

Figura 15 - Classificação visual dos cometas do filé de Tilápia no Teste do Cometa, aumento de 400X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Legenda da figura 15: foto A = cometa tipo 1, foto B = cometa tipo 2, foto C = cometa tipo 3, foto D = cometa tipo 4, foto E = cometa tipo 5

Figura 16 - Artefatos encontrados nas lâminas preparadas a partir do filé de Tilápia no Teste do Cometa, no 14º dia de análise, aumento de 200X

Fonte: (PACOLA, G. S., 2013)

Novamente, o excesso de fluorescência encontrado na lâmina, muito provavelmente causado pela intensa concentração de células bacterianas, causaram os artefatos. Estes achados reforçaram ainda mais a necessidade de se proceder, além da leitura através do Software CometScore®, também pelo método visual.

Com o decorrer da vida útil de produtos alimentícios, especialmente aqueles de origem animal, mantidos refrigerados, vai ocorrendo lenta proliferação da microbiota acompanhante. Como as alíquotas analíticas foram retiradas diretamente dos filés, sem nenhum procedimento prévio de lavagem ou desinfecção, acredita-se que ao longo dos dias houve aumento da concentração microbiana, provavelmente de bactérias deteriorantes, na superfície dos filés. Cerda e Koppen (1998), também identificaram estruturas semelhantes, estudando musculatura de frango armazenada sob temperatura de 2 a 4°C, durante 12 dia. Os autores identificaram essas estruturas que aumentavam em concentração nas

lâminas, com o decorrer do tempo de estocagem da carne de frango. Concluíram que a fragmentação do DNA e a evolução do padrão dos cometas, das células do tecido em estudo também aumentavam com o decorrer da vida útil do produto. Os autores relatam que no primeiro dia havia predominância de cometas tipo 1 e 2, no músculo de frango fresco, com raros cometas tipos 4 e 5. A partir do 10º dia, já eram frequentes os cometas tipo 5 e raros aqueles tipo 1. Os autores finalizam o estudo afirmando que o Teste do Cometa pode ser utilizado para avaliar o estado de frescor de músculo de frango.

Conclusão semelhante aos autores acima citados, foi encontrada por Faullimel et al. (2005), avaliando carne de peito de frango e fígado de frango armazenados à 4°C por 9 dias, também pelo Teste do Cometa. Confrontando a morfologia dos cometas das amostras com carne fresca de frango, observaram que os resultados obtidos para carne fresca mantinham sempre o mesmo padrão de aspecto, com cometas do tipo 1 e 2, enquanto que, com o decorrer da vida útil das amostras refrigeradas, gradativamente, identificavam-se cometas 3, 4 e 5, quanto mais próximo do vencimento do produto. O fígado apresentou avançado grau de deterioração, revelado pelo Teste do Cometa a partir do 4º dia de armazenamento, e a carne de peito, a partir do 7º dia de armazenamento. Entende-se a diferença apresentada entre fígado e carne de ave, pelo fato do parênquima hepático manter intensa atividade enzimática, quando comparada às amostras de tecido muscular. O fato do Teste do Cometa identificar essa significativa diferença entre o parênquima hepático e a musculatura de frango, em poucos dias de diferença, demonstra o grau de "sensibilidade" que o teste possui, podendo identificar diferenças entre amostras com poucos dias entre as análises.

Duarte (2009), ainda utilizando o Teste do Cometa quis verificar se o teste era capaz de apontar alterações celulares, quando da imposição às amostras variações de temperatura e tempo de armazenamento. Submeteu fígado de frango ao congelamento, mantendo-o à -10°C e -15°C durante seis dias. Também observou que com o passar do tempo aumentava de forma gradual a deterioração celular, o que se refletia na morfologia e tipo de cometa, notou também que as amostras mantidas a -15°C, apresentaram as células mais preservadas do que aquelas cujo produto foi mantido a -10°C. Tal fato aponta que para alimentos

altamente perecíveis, como pescado e carnes, além da necessidade da manutenção da cadeia de frio, esta deve sofrer o menor grau de variações possíveis, para se conseguir o máximo frescor e expressão das qualidades sensoriais do produto.

Não foi encontrado na literatura, nenhum estudo utilizando o Teste do Cometa para estudar e explorar o tema “vida útil” de produtos de origem animal, como o pescado. Afirmação importante feita por Cerda e Koppen (1998), autores já citados anteriormente, quando dizem que os resultados encontrados na avaliação de frescor de musculatura de frango pode também servir para avaliações de frescor de outros produtos cárneos.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o Teste de Cronbach para averiguar a consistência interna das amostras, o que está apresentado na tabela 14. A tabela 15 mostra o uso do Teste de Cochran para a verificação da Reprodutibilidade dos resultados (PERRIN, 1995). Todos os valores que apresentaram significância estatística, ou seja, atingiram valor de $p < 5\%$, estão destacados em negrito nas tabelas abaixo.

Tabela 14 - Coeficientes de Cronbach para as variáveis estudadas no Teste do Cometa - São Paulo - 2013

	Variáveis	Coeficiente de Cronbach	Significância (p)
Variáveis Categóricas	MB - Pseudomonas	—	—
	MB - Enterobactérias	—	—
	MB - Mesófilos	> 0,999	< 0,001
	MB - Psicrotróficos	> 0,999	< 0,001
	FQ - N-BVT	> 0,999	< 0,001
	FQ - pH	> 0,999	< 0,001
	FQ - TMA	> 0,999	< 0,001
	SS - Odor	0,913	0,002
	SS - Textura	0,9	0,003
	SS - Aparência	0,563	0,149
	SS - Intenção de Compra	0,913	0,002
Variáveis Escalares	MB - Pseudomonas	0,827	0,017
	MB - Enterobactérias	0,931	0,001
	MB - Mesófilos	0,908	0,003
	MB - Psicrotróficos	0,946	< 0,001
	FQ - N-BVT	0,991	< 0,001
	FQ - pH	0,787	0,03
	FQ - TMA	0,981	< 0,001
	SS - Odor	0,98	< 0,001
	SS - Textura	0,981	< 0,001
	SS - Aparência	0,959	< 0,001
	SS - Intenção de Compra	0,983	< 0,001
	TC - Comet Score	0,957	< 0,001
	TC - Avaliação Visual	0,962	< 0,001

.Legenda da tabela 14: MB = parâmetro microbiológico; FQ = parâmetro físico-químico; SS = parâmetro sensorial; TC = parâmetro do Teste do Cometa; - = ausência de valor para os parâmetros indicados.

Tabela 15 - Teste de Cochran para as variáveis estudadas no Teste do Cometa, São Paulo, 2013.

	Variáveis	Significância (p)
Variáveis Categóricas	MB - Pseudomonas	> 0,999
	MB - Enterobactérias	> 0,999
	MB - Mesófilos	> 0,999
	MB - Psicrotróficos	> 0,999
	FQ - N-BVT	> 0,999
	FQ - pH	> 0,999
	FQ - TMA	> 0,999
	SS - Odor	0,368
	SS - Textura	0,368
	SS - Aparência	0,223
	SS - Intenção de Compra	0,368
Variáveis Escalares	MB - Pseudomonas	0,819
	MB - Enterobactérias	0,074
	MB - Mesófilos	0,247
	MB - Psicrotróficos	0,449
	FQ - N-BVT	> 0,999
	FQ - pH	0,819
	FQ - TMA	0,819
	SS - Odor	0,678
	SS - Textura	0,476
	SS - Aparência	0,268
	SS - Intenção de Compra	0,074
	TC - Comet Score	0,018
	TC - Avaliação Visual	0,607

Legenda da tabela 15: MB = parâmetro microbiológico; FQ = parâmetro físico-químico; SS = parâmetro sensorial; TC = parâmetro do Teste do Cometa.

Os valores dos resultados dos Coeficientes de Cronbach encontrados na tabela 14 (com exceção de SS – Aparência) indicam que o estudo foi realizado a partir de amostras não-viesadas. Também, os altos valores de significância encontrados no Teste de Cochran (Tabela 15) indicam que não existem diferenças entre os três elementos amostrais originais, quando comparados concomitantemente, para as variáveis de interesse (com exceção de TC - Comet

Score). A partir dessa constatação escolheu-se aleatoriamente um dos elementos amostrais transpostos para ser utilizado nas análises seguintes.

Abaixo, a tabela 16 mostra os resultados de correlações entre as variáveis escalares: MB - Pseudomonas, MB - Enterobactérias, MB - Mesófilos, MB - Psicrotróficos, FQ - N-BVT, FQ - pH, FQ - TMA, SS - Odor, SS - Textura, SS - Aparência, SS - Intenção de Compra, TC - Comet Score e TC - Avaliação Visual; e as variáveis categóricas: MB - Mesófilos, MB - Psicrotróficos, FQ - N-BVT, FQ - pH, FQ - TMA, SS - Odor, SS - Textura, SS - Aparência, SS - Intenção de Compra; mostrando o grau de relacionamento das variáveis que possuem pontos de corte, utilizando padrões ou limites de corte, e as variáveis numéricas, que mostram na totalidade o valor encontrado pelas análises.

As tabelas 17 e 18 mostram a correlação das variáveis categóricas e escalares com as variáveis do Teste do Cometa (avaliado através do CometScore®) e pela Avaliação Visual, mostrando, enfim, o grau de correlação de cada variável de interesse estudada com as variáveis do Teste do Cometa.

Tabela 16 - Correlações de Spearman entre as variáveis escalares e categóricas do Teste do Cometa - São Paulo - 2013

Correlação de Spearman			Variáveis Categóricas								
			MB - Mesófilos	MB - psicrotróficos	FQ - N-BVT	FQ - pH	FQ - TMA	SS - Odor	SS - Textura	SS - Aparência	SS - Intenção de Compra
Variáveis Escalares	MB - Pseudomonas	Coef. Correl. (r)	0,725	0,725	0,74	—	0,889	0,889	0,74	0,181	0,889
		Sig. (p)	0,165	0,165	0,152	—	0,044	0,044	0,152	0,77	0,044
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	MB - Enterobactérias	Coef. Correl. (r)	0,707	0,707	0,866	—	0,866	0,866	0,866	0,707	0,866
		Sig. (p)	0,182	0,182	0,058	—	0,058	0,058	0,058	0,182	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	MB - Mesófilos	Coef. Correl. (r)	0,707	0,707	0,577	—	0,866	0,866	0,577	0,707	0,866
		Sig. (p)	0,182	0,182	0,308	—	0,058	0,058	0,308	0,182	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	MB - Psicrotróficos	Coef. Correl. (r)	0,707	0,707	0,866	—	0,866	0,866	0,866	0,354	0,866
		Sig. (p)	0,182	0,182	0,058	—	0,058	0,058	0,058	0,559	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	FQ - N-BVT	Coef. Correl. (r)	0,707	0,707	0,866	—	0,866	0,866	0,866	0,354	0,866
		Sig. (p)	0,182	0,182	0,058	—	0,058	0,058	0,058	0,559	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	FQ - pH	Coef. Correl. (r)	0,707	0,707	0,866	—	0,866	0,866	0,866	0,354	0,866
		Sig. (p)	0,182	0,182	0,058	—	0,058	0,058	0,058	0,559	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	FQ - TMA	Coef. Correl. (r)	0,354	0,354	0,866	—	0,866	0,866	0,866	0,354	0,866
		Sig. (p)	0,559	0,559	0,058	—	0,058	0,058	0,058	0,559	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	SS - Odor	Coef. Correl. (r)	-0,725	-0,725	-0,74	—	-0,889	-0,889	-0,74	-0,725	-0,889
		Sig. (p)	0,165	0,165	0,152	—	0,044	0,044	0,152	0,165	0,044
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	SS - Textura	Coef. Correl. (r)	-0,707	-0,707	-0,866	—	-0,866	-0,866	-0,866	-0,707	-0,866
		Sig. (p)	0,182	0,182	0,058	—	0,058	0,058	0,058	0,182	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	SS - Aparência	Coef. Correl. (r)	-0,707	-0,707	-0,577	—	-0,866	-0,866	-0,577	-0,707	-0,866
		Sig. (p)	0,182	0,182	0,308	—	0,058	0,058	0,308	0,182	0,058
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	SS - Intenção de Compra	Coef. Correl. (r)	-0,725	-0,725	-0,889	—	-0,889	-0,889	-0,889	-0,544	-0,889
		Sig. (p)	0,165	0,165	0,044	—	0,044	0,044	0,044	0,343	0,044
		n	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Legenda da tabela 16: MB = parâmetro microbiológico; FQ = parâmetro físico-químico; SS = parâmetro sensorial; TC = parâmetro do Teste do Cometa; - = valor muito estável, não gerando correlação no parâmetro indicado.

Tabela 17 - Correlações de Spearman das variáveis categóricas com as leituras do Teste do Cometa - São Paulo - 2013

Variável	Estatística	TC - Comet Score	TC - Avaliação Visual
Variáveis Categóricas	MB - Mesófilos	Coef. Correl. (r)	0,559
		Sig. (p)	0,148
		n	5
	MB - Psicrotrofos	Coef. Correl. (r)	0,745
		Sig. (p)	0,148
		n	5
	FQ - N-BVT	Coef. Correl. (r)	0,913
		Sig. (p)	0,03
		n	5
	FQ - pH	Coef. Correl. (r)	—
		Sig. (p)	—
		n	5
	FQ - TMA	Coef. Correl. (r)	0,761
		Sig. (p)	0,03
		n	5
	SS - Odor	Coef. Correl. (r)	0,913
		Sig. (p)	0,03
		n	5
	SS - Textura	Coef. Correl. (r)	0,913
		Sig. (p)	0,03
		n	5
	SS - Aparência	Coef. Correl. (r)	0,559
		Sig. (p)	0,327
		n	5
	SS - Intenção de Compra	Coef. Correl. (r)	0,761
		Sig. (p)	0,03
		n	5

Legenda da tabela 17: MB = parâmetro microbiológico; FQ = parâmetro físico-químico; SS = parâmetro sensorial; TC = parâmetro do Teste do Cometa; - = valor muito estável, não gerando correlação no parâmetro indicado.

Tabela 18 - Correlações de Spearman das variáveis escalares com as leituras do Teste do Cometa - São Paulo - 2013

Variável		Estatística	TC - Comet Score	TC - Avaliação Visual
Variáveis Escalares	MB - Pseudomonas	Coef. Correl. (r)	0,973	0,865
		Sig. (p)	0,005	0,058
		n	5	5
	MB - Enterobactérias	Coef. Correl. (r)	0,791	0,949
		Sig. (p)	0,111	0,014
		n	5	5
	MB - Mesófilos	Coef. Correl. (r)	0,632	0,738
		Sig. (p)	0,252	0,155
		n	5	5
	MB - Psicrotróficos	Coef. Correl. (r)	0,949	0,949
		Sig. (p)	0,014	0,014
		n	5	5
	FQ - N-BVT	Coef. Correl. (r)	0,949	0,949
		Sig. (p)	0,014	0,014
		n	5	5
	FQ - pH	Coef. Correl. (r)	0,949	0,949
		Sig. (p)	0,014	0,014
		n	5	5
	FQ - TMA	Coef. Correl. (r)	0,949	0,791
		Sig. (p)	0,014	0,111
		n	5	5
	SS - Odor	Coef. Correl. (r)	-0,73	-0,865
		Sig. (p)	0,161	0,058
		n	5	5
	SS - Textura	Coef. Correl. (r)	-0,791	-0,949
		Sig. (p)	0,111	0,014
		n	5	5
	SS - Aparência	Coef. Correl. (r)	-0,632	-0,738
		Sig. (p)	0,252	0,155
		n	5	5
	SS - Intenção de Compra	Coef. Correl. (r)	-0,892	-0,973
		Sig. (p)	0,042	0,005
		n	5	5

Legenda da tabela 18: MB = parâmetro microbiológico; FQ = parâmetro físico-químico; SS = parâmetro sensorial; TC = parâmetro do Teste do Cometa.

Como é possível observar na tabela 16 (página 80), existem altos graus de correlação entre as variáveis, passando dos valores 0,750 e chegando próximas ao valor máximo "1". Porém somente são consideradas fortemente correlacionadas as variáveis que atingiram o valor de significância "p", menor do que 5%.

Para valores de "r" positivo, entendeu-se que a relação entre eles é proporcional, quando um aumenta o outro também ou quando um diminui o outro

também. Para valores de “r” negativo, entendeu-se que as variáveis apresentam comportamento contrário, isto é, quando uma aumenta a outra diminui e vice-versa.

Os valores negativos de “r” encontrados nas variáveis sensoriais significam "sentido contrário" em sua correlação. Na análise sensorial, quanto mais elevado o grau de frescor do produto maior a pontuação obtida nas avaliações, já nos testes microbiológicos, quanto maior as contagens, maior o comprometimento da qualidade higiênica ou higiênica e sanitária do produto. Esse comportamento dos parâmetros estudados faz com que ora a correlação entre variáveis seja positiva e ora negativa. O que se pode apreender dos resultados, é que com o passar do tempo de vida útil do produto, todas as variáveis indiquem o mesmo sentido de avaliação, isto é, a perda do frescor e o aumento de características que definem a deterioração e impropriedade para comercialização e consumo.

Um ponto importante a ser observado na tabela 16 (página 80), são as fortes correlações dos parâmetros sensoriais, em especial da variável “Intenção de Compra”, com relação a outras variáveis. Esse parâmetro parece reunir em si, diversos parâmetros julgados indiretamente pelo avaliador, para que só então possa expressar sua opinião. O parâmetro Intenção de Compra foi a variável que revelou o maior número de correlações com os outros parâmetros: FQ - N-BVT, FQ - TMA, SS - Odor, SS - Textura e SS - Intenção de Compra.

Este achado foi bastante interessante, considerando que a avaliação sensorial foi realizada por “não-especialistas”, isto é, consumidores que dispõem de conhecimento acumulado ao longo da vida, durante a escolha, compra e preparo do produto, conhecimento popular, empírico. Isso demonstra, como foi dito anteriormente, a importância que o parâmetro Intenção de Compra possui na análise, sintetizando a avaliação de todos os outros parâmetros sensoriais em uma só decisão do avaliador.

Analisando-se as tabelas 17 (página 81) e 18 (página 82) é possível verificar que tanto a avaliação pelo CometScore®, quanto a Avaliação Visual possuem comportamento muito similar, evidenciando fortes correlações com as variáveis categóricas e escalares, com valor de “p” < 5%. Em algumas situações tanto a leitura pelo CometScore®, quanto a Avaliação Visual revelaram forte correlação,

como pode ser observado com as variáveis escalares MB - Psicrotróficos, FQ - N-BVT, FQ - pH e SS - Intenção de Compra. Esses resultados permitem concluir que as duas formas de leitura (CometScore® e Visual) são passíveis de serem utilizadas e que de acordo com os parâmetros que são confrontados, uma ou outra forma pode ser mais indicada.

Importante salientar que para se realizar as leituras de cometas, por um ou outro método é necessário que: 1) o executor deve ser previamente treinado no uso do software e na observação e classificação dos cometas; 2) sempre a mesma pessoa deverá fazer as leituras, do início ao fim do estudo e 3) deverá ser definido um tempo máximo de atividade em leitura dos cometas, evitando exaustão visual do executor e, conseqüentemente, aumento da probabilidade de ocorrência de erros.

O fato das variáveis escalares possuírem maior correlação com as variáveis do Teste do Cometa é devido a sua natureza como teste ser também de origem escalar, não possuindo ainda limites estabelecidos para gerar as variáveis categóricas. Assim, apresentam maior correlação com as variáveis escalares do que com as variáveis categóricas, possuindo 12 fortes correlações com as variáveis escalares, e comente cinco fortes correlações com as variáveis categóricas, como pode ser constatado nas tabelas 17 (página 81) e 18 (página 82), respectivamente.

Novamente, na tabela 18, a variável categórica SS - Intenção de Compra apresentou forte correlação com ambas as leituras do Teste do Cometa, apontando novamente a importância das avaliações sensoriais em análises de alimentos. Já a variável categórica "SS - Aparência" apresentou os menores valores de correlação do grupo de parâmetros sensoriais, o que aponta que a avaliação sensorial por Aparência, pode ser um item de fraco poder na avaliação sensorial do filé de Tilápia refrigerada. Entretanto, parâmetros mais amplos como Intenção de Compra, que sintetizam maior confluência de outros parâmetros parecem possuir maior poder de decisão nas avaliações do que os parâmetros individualizados.

6 CORRELAÇÃO DOS MÉTODOS CONVENCIONAIS COM O TESTE DO COMETA

A correlação dos resultados das diversas avaliações (físico-química, microbiológica e sensorial) com aqueles obtidos no Teste do Cometa, foi feita a partir das médias dos valores obtidos para cada um dos parâmetros. Essa média foi confrontada com o padrão existente para o referido parâmetro para julgar se o produto estava próprio ou impróprio para o consumo. A partir daí construiu-se a tabela 19 que apresenta os parâmetros estudados e a partir de qual dia apresentou pelo menos um resultado impróprio. Ainda na mesma tabela, na 3ª e 4ª coluna relacionaram-se os tipos de cometa encontrados nas amostras avaliadas em paralelo aos métodos convencionais, pela leitura CometScore® e pela leitura Visual.

Tabela 19 - Dias úteis decorridos dos filés de Tilápia refrigerados nos quais apareceram condições impróprias para o consumo e tipo de Cometa predominante, de acordo com o parâmetro estudado - São Paulo - 2013

Variáveis Categóricas		Tipo de Cometa Predominante	
Parâmetro	Dia da Análise	CometScore®	Visual
FQ - pH	-	-	-
MB - Psicrotróficos	0	3	2
MB - Mesófilos	5º	3	3
FQ - TMA	9º	5	5
SS - Odor			
SS - Intenção de Compra			
FQ - N-BVT	12º	5	5
SS - Textura			
SS - Aparência	14º	5	5

Legenda da tabela 19: MB = parâmetro microbiológico; FQ = parâmetro físico-químico; SS = parâmetro sensorial; - = nenhum resultado foi classificado como impróprio.

A média do pH foi considerada aceitável durante o estudo. Para o parâmetro MB – Psicrotróficos, desde o primeiro dia de análise, encontraram-se resultados que ultrapassavam o padrão para o produto. No Teste do Cometa, neste tempo,

predominavam o tipo 3, condição intermediária de grau de lesão celular, revelada pelo teste. O parâmetro MB - Mesófilos também apresentou, a partir da média das contagens, produto impróprio a partir do 5º dia, ou seja, do segundo dia de análise.

Com relação aos parâmetros microbiológicos, no dia zero e no quinto dia útil do produto já se encontrou impropriedade com relação aos microrganismos psicotróficos e mesófilos, respectivamente. Para essas duas situações predominaram cometas do tipo três.

Os nove dias de vida útil dos filés, a média dos parâmetros físico-químicos e sensoriais apresentava valores indicativos de produto impróprio: FQ - TMA, SS - Odor e SS - Intenção de Compra e no Teste do Cometa, encontrou-se nível máximo (tipo 5) de dano celular e fragmentação de DNA. É interessante notar que o Teste do Cometa conseguiu revelar o grau máximo de dano celular ao mesmo tempo em que as provas físico-químicas e a percepção dos avaliadores apontavam, de forma indireta, a perda do frescor e condições de consumo do produto, evidenciando concordância dos métodos.

Aos 12 dias de vida útil dos filés de Tilápia, refrigerados, correspondendo à 4ª análise, os parâmetros FQ - N-BVT e SS - Textura revelaram-se impróprios; enquanto o parâmetro SS - Aparência só apresentou média de resultados impróprios a partir do 14º dia, 5ª análise.

Entende-se, neste estudo, que o parâmetro SS - Aparência e o parâmetro FQ - pH não se revelaram bons indicadores de alterações dos filés de Tilápia, no decorrer do tempo de estudo.

O prazo de validade do produto, estabelecido pelo fabricante está definido em 10 dias, mantido a até 5°C, porém no 9º dia de análise, obteve-se o maior número de parâmetros com resultados impróprios: concentração de TMA, Odor e rejeições com relação à Intenção de Compra e também a partir do 9º até o final do estudo, ao 14ª dia, predominaram os cometas do tipo 5, tanto na leitura pelo Software CometScore® quanto leitura Visual. O fato de se ter concordância nos tipos de cometa (5) a partir do 9º dia, tanto na leitura pelo Software quanto Visual leva a crer que esta última pode ser uma opção confiável de leitura, quando da indisponibilidade do software.

Não se sabe se entre o 5º dia de análise e o 9º dia de análise, ocorreram variações de comportamento dos testes, seja dos métodos convencionais seja do Cometa. Para estudos futuros sugere-se a realização de avaliações com intervalos menores de tempo, dando oportunidade de se conhecer melhor o comportamento do Teste do Cometa e sua relação com as outras técnicas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo ratifica a importância da avaliação sensorial dos produtos de origem animal *in natura*, confirmando que o julgamento do frescor do pescado a partir dos sentidos humanos e de seu conhecimento acumulado sobre o produto, mesmo empírico, como é o caso de avaliadores consumidores não treinados, quando confrontados com parâmetros caracterizados pelos métodos convencionais de julgamento - físico-químicos e microbiológicos - são concordantes, seguem uma mesma lógica no apontar da evolução dos processos de deterioração e autólise do produto.

O Teste do Cometa é utilizado no setor alimentício, porém não se encontrou trabalhos que avaliassem frescor de produtos. Os resultados aqui obtidos indicam que esta técnica é satisfatória também para esse tipo de estudo. Apontou Duarte (2009) que o Teste do Cometa permite discriminar diferenças de grau de dano celular com consequente fragmentação de DNA a partir de pequenas diferenças de temperatura e falhas da cadeia de frio em tecido cárneo e vísceras. No presente estudo pode-se notar relação entre aparecimento de parâmetros impróprios nos filés de Tilápia refrigerados com a ocorrência de cometas do tipo 3. Acredita-se que estudos posteriores poderão esclarecer mais precisamente quais parâmetros relacionam-se de forma mais direta e harmônica conforme o produto vai consumindo seu tempo de vida útil.

Sendo este uma primeira aplicação do Teste do Cometa no estudo de vida útil do pescado, vários aspectos relativos à realização do método foram observados e merecem atenção especial, no sentido de aprimorar a metodologia para os estudos futuros. Relacionam-se aqui alguns desses pontos: 1) para a redução da ocorrência dos artefatos corados e fluorescentes nas lâminas, sugere-se a lavagem das alíquotas analíticas com solução fisiológica estéril antes de se proceder ao protocolo descrito no item 4.7.4.2 (página 41), o que possibilitará a redução mecânica de parte das bactérias contaminantes do produto; 2) redução do intervalo de tempo com relação aos dias de análise, aumentando a quantidade de informações sobre o comportamento do Teste do Cometa e 3) a introdução de

mais parâmetros de avaliação, como nas provas sensoriais, a Degustação do Produto.

A falta de padrões para determinados parâmetros, ou mesmo especificações e limites críticos na literatura, dificulta a interpretação e discussão de determinados temas, como, por exemplo, a contagem de *Pseudomonas* spp. O desenvolvimento de outros estudos, sobre o mesmo tema permitirá ampliar conhecimento, podendo, inclusive sugerir alguns limites.

A partir da realização deste estudo, acredita-se que o Teste do Cometa possa ser utilizado na indústria de alimentos para indicar o grau de dano celular sofrido por tecidos orgânicos a partir de situações de danos e injúrias que o produto pode sofrer durante o seu processamento, armazenamento, conservação e distribuição.

8 CONCLUSÃO

- O Teste do Cometa se presta para o estudo de vida útil de filés de Tilápia refrigerados.
- O Teste do Cometa, classificando dano celular em tipos de 1 a 5 apresentou correlação com os métodos convencionais de avaliação de frescor e qualidade higiênica e higiênico-sanitária de filés de Tilápia, refrigerados.
- A partir do 9^a dia de vida útil dos filés de Tilápia refrigerados predominavam cometas do tipo 5, indicando o grau máximo de dano celular e fragmentação de DNA das células, pelo Teste do Cometa, o que coincidiu com a rejeição da Intenção de Compra na análise sensorial.
- O presente estudo abriu novas oportunidades para o uso do Teste do Cometa no setor alimentício, fazendo-se necessário realizar outros estudos para que sua utilização seja, de fato, eficiente e eficaz no setor.

REFERÊNCIAS²

ABABOUCHE, L. H.; SOUIBRI, L.; RHALIBY, K.; OUAHDI, O.; BATTAL, M.; BUSTA, F. F. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. **Food Microbiology**, v. 13, p. 123–132, 1996.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14141: escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro, 1998.

ALBUQUERQUE, W. F.; ZAPATA, J. F. F.; ALMEIDA, R. S. 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.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Brasília, DF: ANVISA, 2001.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC, APHA, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Rio de Janeiro, RJ: MAPA, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 20, de 21 julho de 1999. Métodos Analíticos Físico-químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura**. Brasília, DF: MAPA, 1999.

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação**. Rio de Janeiro, 2002. 7 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2006. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Brasília, DF: MAPA, 2006.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Análise da balança comercial brasileira – Ano 2006.** Brasília, DF: MPA, 2006. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Dados_estatisticos/BALAN%C3%87A%20COMERCIAL%20BRASILEIRA%20DE%20PESCADOS_2006.pdf>. Acesso em: 27 maio 2010.

CERDA, H. Detection of irradiated fresh chicken, pork and fish using the dna comet assay. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 31, p. 89-92, 1998.

CERDA, H.; DELINCÉE, H.; HAINE, H.; RUPP, H. The DNA 'comet assay' as a rapid screening technique to control irradiated food. **Mutation Research**, v. 375, n. 2, p. 167–181, 1997.

CERDA, H.; KOPPEN, G. DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. **Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung**, v. 207, p. 22-25, 1998.

CHESCA, A. C.; PEIXOTO, C. P.; COSTA, D. G.; NASCIMENTO, H. N. do; PINTO, I. R. A.; GUIMARÃES, J. L. P.; TARQUINIO, L. B.; OKURA, M. H. Levantamento das temperaturas de armazenamento de carnes, em Açougues e Supermercados de Uberaba, MG. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 81, p. 51-55, 2001.

CHYTIRI, S.; CHOULIARA, I.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. **Food Microbiology**, v. 21, p. 157-165, 2004.

DUARTE, R. C. **Teste do cometa como ferramenta de controle da cadeia do frio.** 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia nuclear) - Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, São Paulo, 2009.

EI-SAYED, A. M. **Tilapia culture**. UK, Oxfordshire: CABI Publishing, 2006.

EVES, A.; TURNER, C.; YAKUPITIYAGE, A.; TONGDEE, N.; PONZA, S. The microbiological and sensory quality of septage raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 132, p. 261-272, 1995.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2012**. Rome: FAO, Fisheries and Aquaculture Department, 2012. p. 230. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION FOR THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Codex Alimentarius**: code of practice for fish and fishery products. Rome, 2009. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10273/CXP_052e.pdf>. Acesso em: 26 set. 2010.

FAULLIMEL, C.; SAID, E.; DALAL, A.; GUTERL, P.; MARCHIONI, E. DNA Comet Assay for the Detection of Time-Temperature Abuse during the Storage of Poultry. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 7, p. 1414-1420, 2005.

FU, B.; LABUZA, T. P. Considerations for the Application of Time-Temperature Integrators in Food Distribution. **Journal of Food Distribution Research**, v. 23, p. 9-18, 1992.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

GÓES, J. A. W.; SILVA, A. V. da; FRACALOSSO, L. M.; KUWANO, E. A. Condições de conservação de alimentos armazenados por refrigeração na cidade de Salvador, Bahia. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 125, p. 41-43, 2004.

HORWITZ, W.; LATIMER, G. **AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18. ed. Maryland: AOAC International, 2005.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Estatística da pesca 2006 Brasil**: grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, DF: IBAMA, 2008. p. 181. Disponível em: <http://www.conepe.org.br/sistema/arquivos_pdf/ibama/estatisiticadapesca2006ibama.pdf>. Acesso em: 2 jun. 2010.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003**: aquisição alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2004. 251 p. Disponível em: <<http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002aquisicao/aquisicao.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2010.

INSTITUTO DE PESCA. **Manual de controle de qualidade do pescado**. 2. ed. Santos, SP: Instituto de Pesca, 2007a.

INSTITUTO DE PESCA. **Procedimentos higiênico-sanitários para a indústria e inspetores de pescado**: recomendações. Santos, SP: Instituto de Pesca, 2007b.

INSTITUTO DE PESCA. **Produção Pesqueira Marinha do Estado de São Paulo no Ano 2004**. São Paulo, SP: Instituto de Pesca, 2005. n. 20. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/20_serreltec.pdf>. Acesso em: 27 maio 2010.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - 13720. **Meat and Meat products - Enumeration of *Pseudomonas spp.*** Suíça: ISO, 2010.

KHAN, H. M.; DELINCÉE, H. Detection of irradiation treatment of foods using DNA "Comet Assay". **Radiation Physics and Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 141-144, 1998.

LINNAEUS, C. **Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis**. 10. ed. Suécia, Estocolmo: L. Salvii, 1758. v.1.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4. ed. EUA, New Jersey: CRC Press, 2006.

ÓLAFSDÓTTIR, G.; MARTINSDÓTTIR, E.; OEHLenschläger, J.; DALGAARD, P.; JENSEN, B.; UNDELAND, I.; MACKIE, I. M.; HENEBAN, G.; NIELSEN, J.; NILSEN, H. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 8, p. 258-265, 1997.

PARK, J. H.; HYUN, C. K.; JEONG, S. K.; YI, M. A.; JI, S. T.; SHIN H. K. Use of the single cell gel electrophoresis assay (Comet assay) as a technique for monitoring low-temperature treated and irradiated muscle tissues. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 555-561, 2000.

PERRIN, E. B. SAC Instrument Review Process. **Medical Outcomes Trust Bulletin**. v. 3, n. 4, p. 1, 1995.

PIMENTEL, L. P. S.; PANETTA, J. C. Condições higiênicas do gelo utilizado na conservação de pescado comercializado em supermercados da grande São Paulo. Parte 1, Resultados Microbiológicos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 56-63, 2003.

PORNRAT, S.; SUMATE, T.; ROMMANEE, S.; SUMOLAYA, K.; KERR, W. L. Changes in the ultrastructure and texture of prawn muscle (*Macrobrachium rosenbergii*) during cold storage. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1747-1754, 2007.

ROSNER, B. **Fundamentals of biostatistics**. 2. ed. EUA, Massachussets: Duxbury Press, 1986.

SANTOS, C. A. M. L. A qualidade do pescado e a segurança dos alimentos. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DO PESCADO, 2., 2006, São Vicente, **Anais...** São Vicente: Instituto de Pesca, 2006.

SÃO PAULO. (Estado). Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978. **Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas**. São Paulo, SP: Secretaria Geral Parlamentar, 1978.

SIGURGISLADOTTIR, S.; INGVARSDOTTIR, H.; TORRISSEN, O. J.; CARDINAL, M.; HAFSTEINSSON, H. Effects of freezing/thawing on the microstructure and the texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Food Research International**, v. 33, p. 857-865, 2000.

SOARES, A. L. S. **Melhoramento dos Mercados Internos para Produtos Pesqueiros na América Latina e Caribe**. Projeto TCP/RLA/3111 da FAO, 2007. 64 p.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory Evaluation Practices**. 3. ed. San Diego, California: California Academic Press, 2004.

SURENDRAN, P. K.; JOSEPH, J.; SHENOY, A. V.; PERIGREEN, P. A.; MAHADEVA IYER, K.; GOPAKUMAR, K. Studies on Spoilage of Commercially Important Tropical Fishes under Iced Storage. **Fisheries Research**, v. 7, p. 1-9, 1989.

TAOUKIS, P. S.; LABUZA, T. P. Applicability of time-temperature indicators as shelf life monitors of food products. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 783-788, 1989.

UE. UNIÃO EUROPÉIA. **Conselho diretivo 493, de 22 de julho de 1991**: health conditions for the production and placing on the market of fishery products. Bruxelas, Bélgica: Conselho Diretivo, 1991.

VIEIRA, K. V. M.; MAIA, D. C. C.; JANEIRO, D. I.; VIEIRA, R. H. S. F.; CEBALLOS, B. S. O. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em filés congelados. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 37-40, 2000.

VIEIRA, R. H. S. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo, SP: Livraria Varela, 2004.