UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

THAYSSA DUARTE COSTA

Jejum e insensibilização pré-abate em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

Pirassununga

2019

THAYSSA DUARTE COSTA

Jejum e insensibilização pré-abate em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Maria Macedo Viegas

Pirassununga

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C837j Costa, Thayssa Duarte
Jejum e insensibilização pré-abate em tilápia
nilótica (*Oreochromis niloticus*) / Thayssa Duarte
Costa ; orientadora Elisabete Maria Macedo Viegas.
-- Pirassununga, 2019.
115 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Bem-estar animal. 2. Fatores de estresse. 3.
Manejo pré-abate. 4. Qualidade do filé de tilápia.
I. Maria Macedo Viegas, Elisabete , orient. II.
Título.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à Profa. Elisabete Maria Macedo Viegas pela orientação, pelo apoio e pela confiança demonstrada, assim como aos colegas e técnicos do Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA – USP) pela ajuda proporcionada para o desenvolvimento deste trabalho e pelas inúmeras experiências compartilhadas. Um especial agradecimento aos técnicos José Apolinário Ferraz e Daflin Mello.

Agradeço ao pessoal dos diversos Laboratórios do Campus Fernando Costa (FZEA - USP de Pirassununga), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (CEPTA-ICMBio) e a empresa GEAVE pela acessibilidade aos locais, materiais cedidos e pela seriedade com que colaboraram na execução deste projeto. Um especial agradecimento ao técnico Marcelo Thomazini.

Às Profas. Dras. Giuliana Parisi e Judite Lapa Guimarães pela gentil colaboração nas suas observações, enriquecendo de forma significativa este projeto.

Meu eterno agradecimento aos meus pais Cleusa Silva Duarte Costa e Antonio Costa Neto, pelo exemplo de vida, pelo carinho e por ser meu suporte incondicional desde sempre. À minha querida irmã Rayssa Duarte Costa, pela ajuda e afeto que só uma irmã pode compartilhar.

Meu sincero e profundo agradecimento a meu namorado e aos meus queridos amigos/as e a todos quem de uma ou outra forma me apoiaram, dentro e fora do projeto de pesquisa.

Meus agradecimentos ao programa de Pós-graduação em Zootecnia por me permitir formar parte do corpo discente da FZEA e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

RESUMO

COSTA, T. D. **Jejum e insensibilização pré-abate em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*)** [Fasting and stunning pre-slaughter in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)]. 2019. 115 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Procedimentos de pré-abate como jejum e insensibilização são considerados fatores estressantes aos peixes, podendo induzir a uma resolução precoce do *rigor mortis*, alterando assim as características sensoriais e diminuindo a vida útil do produto. No Brasil não existem diretrizes específicas que normatizem essas etapas da produção. Sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a espécie de peixe mais produzida no país, a mesma deve ser amplamente estudada, pois assume grande importância econômica no setor da aquicultura. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes tempos de jejum associado a diferentes métodos de insensibilização pré-abate sobre as alterações biológicas, bioquímicas e de qualidade de carne em tilápias do Nilo. Para isso foram realizados dois experimentos, subdivididos em quatro seções de resultados e discussão. No primeiro experimento, primeira seção, as tilápias foram submetidas à exposição a diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 e 72 horas) e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Após a insensibilização as tilápias foram abatidas, sendo então realizadas análises de sangue (glicose e lactato), e nos filés foram avaliados *rigor mortis*, pH, medidas dielétricas (*Freshness Meter*) e determinação de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e dos seus produtos de degradação (adenosina difosfato – ADP, adenosina-monofosfato - AMP, monofosfato de inosina - IMP, inosina - INO e hipoxantina – Hx), durante 7 dias sob refrigeração. Os resultados apontaram que o jejum prolongado (72 horas) associado a uma insensibilização demorada (hipotermia) prolongam o estresse e o sofrimento das tilápias, e aceleram processos deteriorativos nos filés. Desta forma, esse período de jejum de 72 horas, foi descartado nos experimentos seguintes. No segundo experimento, segunda seção, o estudo teve por objetivo analisar diferentes períodos de jejum (0, 24 e 48h) combinados a métodos de insensibilização (hipotermia e eletronarcose) pré-abate, sobre a hematologia e a bioquímica de tilápia do Nilo. Após a insensibilização as tilápias foram abatidas e então submetidas a análises em sangue (glicose, lactato e amônia; contagem de eritrócitos e leucócitos totais; contagem diferencial de leucócitos); cor do fígado (luminosidade - L*, intensidade da cor vermelho-verde - a* e intensidade da cor amarela-azul - b*); índices médios hepatossomático (IHS); índices viscerossomáticos (IVS); determinação da atividade da glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e lactato desidrogenase (LDH); e determinação de produtos finais da lipoperoxidação (TBARS) oriundas da musculatura da tilápia. Observou-se que o maior período de jejum (48 horas) independentemente do tipo de insensibilização tem efeito direto sobre o estresse metabólico da tilápia, mobilizando a ativação e ação das enzimas antioxidantes e podendo interferir no processo da lipoperoxidação muscular do peixe, levando a uma rápida deterioração do produto a ser comercializado. Na terceira seção, utilizando-se os mesmos jejuns e insensibilizações do experimento anterior, o objetivo foi submeter as tilápias abatidas a análises de rendimento de carcaça, de filé e de resíduo de filetagem; *rigor mortis*; pH; medidas dielétricas (*Freshness Meter*); bases nitrogenadas voláteis (BNV); cor dos filés (luminosidade - L*, intensidade da cor vermelho-verde - a* e intensidade da cor amarela-azul - b*); e determinação de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e dos seus produtos de degradação (adenosina difosfato – ADP, monofosfato de inosina - IMP, inosina - INO e hipoxantina – Hx); sendo as amostras armazenadas sob refrigeração a 3°C por até

14 dias. Neste experimento o jejum de 48h associado a ambas insensibilizações (hipotermia e eletronarcose) provocaram aumento dos processos metabólicos anaeróbios e aceleraram os processos de degradação no filé, porém os resultados apresentados provaram estar de acordo com os requisitos da Legislação Brasileira vigente, para peixe fresco, durante os 14 dias de armazenamento em condições refrigeradas. Na última sessão, foi avaliado se os períodos de jejum (0, 24 e 48 horas) e os métodos de insensibilizações por hipotermia e eletronarcose, teriam efeito sobre a qualidade da carne dos peixes, após armazenamento sob congelamento por 120 dias. Foram realizadas análises de pH; cor dos filés (luminosidade - L^* , intensidade da cor vermelho-verde - a^* e intensidade da cor amarela-azul - b^*); bases nitrogenadas voláteis (BNV); oxidação lipídica (TBARS); perda de água por descongelamento (*drip loss*); capacidade de retenção de água (CRA); em amostras musculares das tilápias a cada 30 dias durante 4 meses. Concluiu-se que o jejum de 48h e a insensibilização por eletronarcose aplicadas nesse estudo causaram coloração mais avermelhada no filé, podendo este produto ser indesejável ao consumidor, assim a escolha de todos os métodos aplicados estavam dentro dos padrões aceitáveis segundo a legislação brasileira.

Palavras-chave: Bem-estar animal; fatores de estresse; manejo pré-abate; qualidade do filé de tilápia.

ABSTRACT

COSTA, T. D. **Fasting and stunning pre-slaughter in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. 2019. 115 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Pre-slaughter procedures such as fasting and numbness are considered stressful to fish and may induce early resolution of *rigor mortis*, thus altering sensory characteristics and decreasing product shelf life. In Brazil there are no specific guidelines that regulate these stages of production. Since Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the most produced fish species in the country, it should be widely studied, as it assumes great economic importance in the aquaculture sector. This study aimed to evaluate the effects of different fasting times associated with different pre-slaughter stunning methods on biological, biochemical and meat quality changes in Nile tilapia. For this, two experiments were performed, subdivided into four sections of results and discussion. In the first experiment, the first section, the tilapia were exposed to different periods of fasting (0, 24, 48 and 72 hours) and later stunned by hypothermia and electronarcosis. After stunning the tilapia were slaughtered, and blood (glucose and lactate) analyzes were performed, and the rigor mortis, pH, dielectric measurements (Freshness Meter) and adenosine-5'-triphosphate (ATP), and the determination of adenosine degradation products (adenosine diphosphate - ADP, adenosine monophosphate - AMP, inosine monophosphate - IMP, inosine - INO and hypoxanthine - Hx) for 7 days under refrigeration. The results showed that prolonged fasting (72 hours) associated with prolonged numbness (hypothermia) prolong the stress and suffering of tilapia, and accelerate deteriorating processes in fillets. Thus, this 72-hour fasting period was discarded in the following experiments. In the second experiment, the second section, the study aimed to analyze different periods of fasting (0, 24 and 48h) combined with pre-slaughter stunning methods (hypothermia and electronarcosis) on hematology and biochemistry of Nile tilapia. After numbness the tilapia were slaughtered and then subjected to blood analysis (glucose, lactate and ammonia; total erythrocyte and leukocyte count; differential leukocyte count); liver color (luminosity - L *, intensity of red-green color - a * and intensity of yellow-blue color - b *); hepatosomatic mean indices (IHS); viscerosomatic indices (IVS); determination of glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and lactate dehydrogenase (LDH) activity; and determination of lipoperoxidation end products (TBARS) derived from the tilapia muscles. It was observed that the longest fasting period (48 hours), regardless of the type of stunning, has a direct effect on tilapia metabolic stress, mobilizing the activation and action of antioxidant enzymes and may interfere in the fish muscle lipoperoxidation process, leading to a rapid deterioration of the product to be marketed. In the third section, using the same fasts and numbness of the previous experiment, the objective was to submit the slaughtered tilapia to carcass yield, fillet and filleting residue analyzes; rigor mortis; pH; dielectric measurements (Freshness Meter); volatile nitrogen bases (BNV); fillet color (luminosity - L *, intensity of red-green color - a * and intensity of yellow-blue color - b *); and determination of adenosine-5'-triphosphate (ATP) and its degradation products (adenosine diphosphate - ADP, inosine monophosphate - IMP, inosine - INO and hypoxanthine - Hx); The samples are stored refrigerated at 3 ° C for up to 14 days. In this experiment, the 48h fasting associated with both numbness (hypothermia and electronarcosis) increased the anaerobic metabolic processes and

accelerated the degradation processes in the fillet, but the results presented proved to be in accordance with the requirements of the current Brazilian legislation for fresh fish. during 14 days of storage under refrigerated conditions. In the last session, it was evaluated whether fasting periods (0, 24 and 48 hours) and methods of stunning by hypothermia and electronarcosis would have effect on fish meat quality after freezing storage for 120 days. PH analyzes were performed; fillet color (luminosity - L^* , intensity of red-green color - a^* and intensity of yellow-blue color - b^*); volatile nitrogen bases (BNV); lipid oxidation (TBARS); defrost water loss; water holding capacity (CRA); in muscle samples from tilapia every 30 days for 4 months. It was concluded that the 48h fasting and the electronarcosis applied in this study caused a reddish color in the fillet, which may be undesirable to the consumer, so the choice of all applied methods were within acceptable standards according to Brazilian law.

Keywords: Animal welfare; stress factors; pre-slaughter management; quality of the tilapia fillet.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Figura A1 - insensibilização por hipotermia, sendo controlado o tempo assim como os reflexos e sentidos sensoriais das tilápias. Em A2 - aplicação da hipotermia. Em B - posicionamento dos fios e placas que insensibilizaram, por corrente elétrica, os peixes.35
- Figura 2 - Concentrações de glicose e lactato sanguíneo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.40
- Figura 3 - Valores médios da medida dielétricas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tipos de jejum e insensibilizadas por hipotermia (esquerda) e eletronarcose (direita) refrigeradas por 7 dias.44
- Figura 4 - Degradação do ATP e seus produtos de degradação em filés de tilápias submetidas a diferentes jejuns (J0-sem jejum; J24-jejum 24h; J48-jejum 48h e J72-jejum 72h) e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) mantidas por 7 dias de armazenamento sob refrigeração....45
- Figura 5 - Índice K em filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração.47
- Figura 6 - Na figura A há detalhes do condicionamento, na B da espécie estudada. Na figura C encontra-se o maquinário utilizado para o choque elétrico e na figura D observa-se coleta de material biológico (sangue)..57
- Figura 7 - Concentrações de glicose (A), lactato (B) e amônia (C) sanguíneo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.61
- Figura 8 - Dados das variáveis hematológicas (eritrócitos, leucócitos e trombócitos totais) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados.63
- Figura 9 - Valores da contagem diferencial de leucócitos (%) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.64
- Figura 10 - Intensidade da cor L*, a* e b* em fígados de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.65
- Figura 11 - Índices somáticos (fígados - IHS e vísceras - IVS) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.66

- Figura 12 - Atividades das enzimas glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e lactato desidrogenase (LDH) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.67
- Figura 13 - Valores de média e desvio padrão de TBARS encontrados nos pontos de coleta das amostras de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.69
- Figura 14 - Rendimento de carcaça (%C), filé (%F) e das vísceras (%S) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose82
- Figura 15 - Índice de *rigor-mortis* (IRM%) em tilápias submetidas a jejuns diferentes e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) refrigeradas por 14 dias.....84
- Figura 16 - Medida dielétrica no músculo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose86
- Figura 17 - Cor nos filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.....89
- Figura 18 - Mudanças da degradação do ATP e valor K de filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose durante 14 dias de armazenamento sob refrigeração..91
- Figura 19 - Dados de pH em tilápias (*Oreochromis niloticus*) inteiras e congeladas submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.. 105
- Figura 20 - Cor instrumental avaliada nos filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose..... 106
- Figura 21 - Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose... 107
- Figura 22 - TBARS em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose..... 108
- Figura 23 - Percentual de perda de água por descongelamento (*drip loss*) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. 109

Figura 24 - Percentual capacidade de retenção de água (CRA) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade de água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) antes e após a aplicação das insensibilizações nas tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum.....	39
Tabela 2 - Índice de Rigor Mortis (IRM) em tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) refrigeradas por 7 dias.....	42
Tabela 3 - Valores de pH muscular de tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes tipos de jejum e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) refrigeradas por 7 dias... ..	43
Tabela 4 - Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade da água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) das caixas onde foram aplicadas as insensibilizações com hipotermia e eletronarcose das tilápias submetidas a jejuns diferentes	60
Tabela 5 - Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade da água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) das caixas onde foram aplicadas as insensibilizações com hipotermia e eletronarcose das tilápias submetidas a jejuns diferentes. ...	82
Tabela 6 - Dados pH em tilápias (<i>Oreochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.....	85
Tabela 7 - BNV no músculo de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose..	87
Tabela 8 - Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade da água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) das caixas onde foram aplicadas as insensibilizações com hipotermia e eletronarcose das tilápias submetidas a jejuns diferentes. ...	104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Aquicultura mundial e no Brasil.....	15
2.2 Tilapicultura no Brasil	16
2.3 Sobre bem-estar e sensibilidade em peixes.....	17
2.4 Estresse em peixes	18
2.5 Procedimentos de pré-abate em peixes.....	20
2.5.1 Sobre o jejum e a insensibilização	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	24
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo Geral	30
4.2 Objetivos Específicos.	30
CAPÍTULO 1. EFEITO DE DIFERENTES MANEJOS PRÉ-ABATE SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DA QUALIDADE DE FILÉS DE TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) MANTIDOS REFRIGERADOS.....	31
RESUMO	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	48
CAPÍTULO 2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) SUBMETIDAS A DIFERENTES MANEJOS NO PRÉ-ABATE	53
RESUMO	53

1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	70
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA CARNE RESFRIADA DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochomis niloticus</i>) SUBMETIDA A DIFERENTES MANEJOS NO PRÉ-ABATE .76	
RESUMO	76
1. INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4. CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	92
CAPÍTULO 4. ESTABILIDADE DA QUALIDADE DA CARNE CONGELADA DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochomis niloticus</i>) SUBMETIDA A DIFERENTES MANEJOS NO PRÉ-ABATE	
RESUMO	98
1. INTRODUÇÃO.....	99
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	101
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4. CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS	111
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura tem sido uma alternativa bastante viável ao crescimento da demanda mundial por proteína animal (ROUBACH et al., 2015; VIEIRA FILHO; FISHLOW, 2017). Segundo dados da FAO (2018), a aquicultura mundial representou aproximadamente 47,0% da produção de pescado no ano de 2016, o equivalente a 80 milhões de toneladas e valor estimado de US\$ 232 bilhões (FAO, 2018).

Dos países produtores de organismos aquáticos, destacam-se a China com mais de 60%, seguidos da Índia, Indonésia, Vietnã, Bangladesh e Egito (FAO, 2018). O Brasil ocupa a 13ª posição entre os 25 principais produtores de organismos aquáticos e é um dos poucos países que podem vir atender à demanda de pescado no futuro (FAO, 2018). Atualmente, a produção aquícola brasileira tem representado cerca de R\$ 4,39 bilhões, com destaque para sistemas de monocultivos intensivamente arraçados na piscicultura (69,9%) e carcinicultura (20,6%) (IBGE, 2016).

Na aquicultura, os procedimentos pré-abate dos peixes como a captura e o transporte são muitas vezes traumáticos e estressantes, podendo causar reações fisiológicas e bioquímicas que afetam substancialmente o produto final, como também motivam a rejeição por parte do consumidor preocupado com o bem-estar animal e com o aspecto do produto ofertado (GALHARDO; OLIVEIRA, 2005). O estresse afeta diretamente a qualidade da carne do pescado, pois já na captura a natação vigorosa leva a um uso intenso do músculo branco, aumentando a glicólise anaeróbica, produção de ácido lático e consequentemente diminuindo o pH muscular (POLI et al., 2005; RAHMANIFARAH; SHABANPOUR; SATTARI, 2011). Portanto, peixes que sofreram estresse no abate entram e saem do *rigor mortis* mais precocemente, fato que afeta a qualidade do produto final (BAGNI et al., 2007).

As operações pré-abate envolvem procedimentos que vão desde o momento do jejum, transporte até a insensibilização e por fim o abate. Mesmo que sejam poucas as informações referentes às perdas da qualidade final do produto durante essas operações, a fase pré-abate é um fator decisivo na otimização dos processos, tendo em vista que é durante essa etapa da produção que os peixes são submetidos a níveis de estresse que podem resultar em redução de peso ou até mesmo levá-los à morte (DAL PONT et al., 2009).

Entre as atividades mais importantes do pré-abate está o jejum, aplicado para favorecer o processo de despesca, classificação, seleção e transporte para o abate (MOLENTO, 2005). Segundo Chicrala e Santos (2013), o tempo de jejum varia de 24 a 48 horas para a maioria das espécies, porém sabendo das particularidades fisiológicas de cada uma deve haver mais estudos sobre a precisão do controle desse tempo. A privação alimentar prolongada em peixes pode levar a corrosão da nadadeira dorsal (devido ao canibalismo), perda de peso, desequilíbrio da homeostase e aumento do estresse (PEDRAZZANI et al., 2008; NIE; CAO; FU, 2017). Sendo assim, observa-se que o jejum em peixes é uma etapa comumente utilizada por produtores e proprietários de frigoríficos, mas poucas pesquisas apontam seu efeito direto sobre a qualidade final da carne em peixes (KOBBERSTEIN; CARNEIRO; URBINATI, 2004).

A insensibilização dos peixes é outro ponto crucial dentro da fase pré-abate, devendo ser rápida para se evitar a diminuição do pH da carne, acelerando a degradação do pescado pela liberação de enzimas proteolíticas (RIBAS et al., 2007; ROBB; KESTIN; WARRISS, 2000). Apesar de já serem aplicadas várias metodologias de insensibilização, como a imersão em água e gelo, aplicação de choque elétrico, narcose por gases e atordoamento percussivo (GRÄNS et al., 2016), não há no Brasil uma legislação específica e vigente de insensibilização em peixes como existe para os bovinos, suínos e aves, visando melhores condições para o bem-estar animal e qualidade da matéria-prima.

Não existem informações conclusivas sobre o melhor método de jejum e insensibilização para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que seja, ao mesmo tempo, menos estressante e que proporcione melhor qualidade de carne. Das espécies cultivadas, a tilápia é a mais importante espécie de peixe do Brasil. Em 2018, 400.280 toneladas de tilápia foram produzidas, com o crescimento de 11,9% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2019). A espécie destaca-se por sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (HAYASHI, 1995; LOVSHIN, 1997), além de ser a espécie de grande preferência de consumo da população em geral (CANDIDO et al., 2006; KUBITZA, 2011).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da combinação de diferentes períodos de jejum e métodos de insensibilização pré-abate, sobre as alterações biológicas, bioquímicas e de qualidade de carne em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura mundial e no Brasil

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

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2018) a aquicultura é um dos setores produtores de alimentos que mais cresce no mundo e a grande proporção (mais de 90%) dessa produção vem de países em desenvolvimento. Em contraste com os sistemas agrícolas terrestres, onde a maior parte da produção global é baseada em um número pequeno de espécies animais e vegetais, o setor da aquicultura é composto por variedades de espécies distintas (algas, crustáceos, moluscos, peixes, entre outros). O grande número de animais cultivados reflete a diversidade do setor, particularmente a grande variedade de espécies candidatas a serem cultivadas em diferentes sistemas de produção (SUBASINGHE, 2005).

Segundo a FAO (2018) a aquicultura será responsável em suprir grande parte da alimentação da população mundial, estimada a aumentar nas próximas duas décadas. Dentro da atividade da aquicultura, destaca-se o cultivo de peixes que praticamente duplicou em um curto espaço de tempo, passando de 32,4 milhões de toneladas (t) em 2000 para 66,6 milhões t em 2012 e produzidos 171 milhões de t de pescado em 2016 (FAO, 2018). Além disso, o consumo de pescado no mundo vem aumentando e isso se deve a uma combinação de fatores como o crescimento populacional, em conjunto com o aumento de renda, urbanização interligadas à forte expansão da produção de peixes e canais de distribuição modernos.

Em relação ao Brasil, sabe-se que é um país que possui características geográficas e climáticas favoráveis para esse tipo de atividade (MPA, 2014), além de nichos regionais potenciais. A aquicultura brasileira apresentou significativo crescimento nos últimos quinze anos, pois houve uma busca por espécies com potencial

para serem criadas em cativeiro e aprimoramento das técnicas para as espécies já cultivadas (LOPES, 2015).

Dentro da aquicultura, a produção de peixes vem ganhando destaque no cenário internacional e no Brasil, comparada a outras atividades agropecuárias (BANDEIRA; NASCIMENTO, 2017). Isso porque o peixe é uma parte importante da dieta para uma grande parte da população mundial. Muitos tipos e formas de peixe e seus derivados estão disponíveis no mercado e são acessíveis principalmente para populações que vivem às margens fluviais e marinhas.

Embora a maior parte dos produtos dessa atividade esteja destinada ao consumo humano, alguns subprodutos também podem ser destinados para fins não alimentares como a farinha de peixe para produção de ração e a quitosana, extraída da carapaça de camarões e óleos para a produção de biocombustíveis (ARANTES et al. 2013; FAO, 2018; MUELBERT et al. 2018).

Isoladamente, a produção de tilápias, espécie de destaque e de grande interesse para os produtores e consumidores desde 2004, despontou dentro da agropecuária no Brasil (BANDEIRA; NASCIMENTO, 2017). Devido às condições de boa adaptação a diferentes ambientes, a produção brasileira vem se especializando na criação e na exploração da tilápia, transformando-a na principal espécie aquícola.

2.2 Tilapicultura no Brasil

As tilápias do gênero *Oreochromis* são nativas do continente Africano e são uma das espécies de peixes de água doce com maior destaque à nível global nos últimos 50 anos, sendo que há produção da espécie em questão em mais de 100 países, sob diversos climas, tipos diferenciados de sistemas de produção e salinidades (FITZSIMMONS, 2000).

Nos registros científicos são reconhecidas mais de 70 espécies de tilápias, sendo a grande maioria originária da África, porém comercialmente apenas quatro espécies conquistaram destaque na aquicultura mundial: a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a tilápia de Moçambique (*O. mossambicus*), a tilápia azul ou tilápia áurea (*O. aureus*) e a tilápia Zanzibar (*O. urolepis hornorum*) (KUBITZA, 2000).

De acordo com Castagnolli (1992), a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida no Brasil em 1971, pelo DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas), que implementou um programa oficial de produção de alevinos de tilápia para povoamento dos reservatórios públicos da região nordeste (TAVARES; PALHARES, 2011). No entanto, a produção comercial apresentou destaque somente a partir de 1990, com o avanço e desenvolvimento de tecnologias voltadas para produção animal (FAO, 2014; KUBITZA, 2011).

A grande produção da tilápia concentra-se em três regiões brasileiras, no nordeste, na região noroeste do Estado de São Paulo e no oeste do Estado do Paraná (ANUALPEC, 2012), e a atividade vem se expandindo e ganhando mercado nas regiões do Norte e no Estado do Mato Grosso do Sul (KUBITZA, 2000; NOGUEIRA, 2003).

A tilápia do Nilo apresenta diversas características desejáveis e importantes para a produção comercial, como carne branca e textura firme, sabor e odor delicado e ausência de espinhos intramusculares em forma de ‘Y’ (VANNUCCINI, 1999). Apresenta outras características interessantes aos produtores, como sua facilidade de reprodução e obtenção de machos que apresentam maiores rendimentos em relação às fêmeas (KUBITZA, 2000). Além disso, seu hábito alimentar onívoro possibilita explorarem eficientemente uma variedade de organismos animais e vegetais sem alterar negativamente seu desempenho (BLANCK, 2008). Adapta-se também a criações em grande escala, ou pequenas criações, constituindo uma espécie de muita importância social e econômica no Brasil (SANTOS et al., 2009).

2.3 Sobre bem-estar e senciência em peixes

Estudos direcionados ao bem-estar em peixes tentam mimetizar condições dentro da criação animal que assegurem aos animais uma boa qualidade de vida e metodologias de abate que garantam também um produto final de alta qualidade (VOLPATO et al., 2007). Portanto é necessário monitorar as práticas de aquicultura e, se preciso, fazer adaptações para garantir um ambiente aquático saudável, de modo que se possa observar um animal em bom estado de saúde, como sendo este o primeiro e mais óbvio estado de bem-estar dos peixes (BARRETO, VOLPATO, 2006).

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

Estudos sobre o bem-estar animal têm sido direcionados já há algum tempo para determinadas espécies de aves e mamíferos e nos últimos vinte anos, com o crescente interesse no mercado aquícola, têm se voltado uma atenção para o bem-estar em peixes. Em alguns países da Europa já existe formulação e aplicação de alguns protocolos que asseguram a proteção e o bem-estar de todos os grupos animais, uma vez que já é reconhecido que os peixes apresentam senciência (EFSA, 2004).

A senciência é definida como a capacidade do animal de ter consciência de sensações, como dor, sofrimento, fome, conforto, desconforto e sua capacidade em diferenciar “bom de ruim”, “prazeroso de desagradável” (PEDRAZZANI et al., 2008). Já foi constatado que os peixes têm memória explícita e apresentam um substrato neurológico que demonstra sensibilidade ao sofrimento (SKJERVOLD; FJAERA; SNIPEN, 2002; SNEDDON 2003), logo, são considerados seres sencientes.

Vale ressaltar que a forma estrutural do cérebro dos peixes distingue-se dos demais animais porque não apresenta o neocórtex, que nos mamíferos superiores é importante para mediar o estado emocional de sofrimento. Porém, alguns estudos comprovaram que a função do neocórtex pode ser realizada por diferentes partes do cérebro em peixes, capazes de reagir à percepção de estímulos dolorosos (HUNTINGFORD; KADRI, 2014; BECKOFF; SHERMAN, 2004), por isso estudos comportamentais, neuroanatômico e neurofisiológicos, ou outros temas relacionados a estímulos dolorosos nos peixes são necessários à compreensão do bem-estar.

2.4 Estresse em peixes

O termo estresse tem sido amplamente debatido e pode ser definido como sendo um reflexo da resposta fisiológica gerada quando o indivíduo percebe ou se depara com

uma ameaça à sua homeostase (WENDEELAR BONGA, 1997, FALCON et al., 2008; NOGA, 2000). Segundo Moberg (2000) as respostas ao estresse podem ser divididas em três estágios gerais: o reconhecimento de um agente estressor, a defesa biológica contra o estressor e as consequências da resposta ao estresse. Santos (2013) ainda complementa que são as consequências dessa resposta ao estresse que irão determinar se o animal está sofrendo de aflição ou simplesmente passando por um episódio/período momentâneo que não terá impacto significativo sobre o seu bem-estar.

A mensuração desse estresse é essencial para compreender melhor os conceitos de risco, ameaça e bem-estar nos animais de forma geral. Como as mudanças na fisiologia são por vezes significativas, assim como as atitudes comportamentais, se torna essencial estudo quanto a tais aspectos nos animais e assim evitar colocar os animais em situações de estresse (MOBERG, 2000; DINIZ; HONORATO, 2012).

Em peixes ainda há uma atenção especial, pois devido ao seu íntimo contato com o ambiente aquático e à sua condição de animal pecilotérmico, os desafios se tornam constantes, os quais vão desde aspectos físico-químicos da água até conflitos de comportamento e classificação hierárquica dentro do cardume ou da população (BARTON, 2002; LINES; SPENCE, 2012; LÓPEZ-LUNA et al., 2013). Sob condições de criação, os desafios naturais se somam àqueles impostos pela atividade, como, por exemplo, práticas de manejo, transporte, tratamentos e altas densidades de estocagem. Desse modo, os animais precisam encontrar meios de lidar com os desafios a fim de confrontá-los e de superá-los, para garantir sua sobrevivência. O somatório das mudanças fisiológicas desencadeadas quando o peixe reage a desafios químicos, físicos e biológicos mais a tentativa de compensação são comumente referidos como respostas ao estresse (WEDEMEYER; BARTON; MC LEAY, 1990).

Em sistemas de criação intensivos de peixes ocorrem práticas de manejo fortemente estressantes, como a captura, o transporte, a densidade de estocagem, a interação social e a alimentação (URBINATI; CARNEIRO, 2004). Dentre todas essas práticas de manejo, a captura é provavelmente uma das etapas mais agressivas e é caracterizada pelo seu caráter agudo, severo e de curta duração (URBINATI; CARNEIRO, 2004). Além dessas etapas utilizadas no manejo de captura outros fatores empregados após a captura afetam diretamente o bem-estar animal, como um período de jejum prolongado - para esvaziar o trato intestinal e facilitar o transporte dos animais até

o local de abate, o processo de insensibilização e o abate propriamente dito (HÅSTEIN et al., 2005).

2.5 Procedimentos no pré-abate em peixes

A legislação brasileira não apresenta nenhum protocolo específico padronizando métodos a serem empregados no pré-abate de peixes. É uma vez que o animal será sacrificado para o consumo humano, devem-se garantir todas as condições humanitárias desde etapas de criação nas fazendas até o momento do abate, realizando essas operações com bastante cautela, causando o mínimo de excitação e desconforto aos animais (LINES; SPENCE, 2012; LÓPEZ-LUNA et al., 2013).

Segundo a legislação brasileira para promover o mínimo de dano aos animais durante os procedimentos de abate, estes devem ser imediatamente conduzidos ao equipamento de insensibilização para garantir a indução e a manutenção dos animais em um estado de inconsciência, garantindo sua insensibilização até a operação de sangria, que deve ser realizada de forma rápida e evitando contusões na carcaça (BRASIL, 2000).

De modo geral, em peixes de criação, as operações pré-abate envolvem os procedimentos que vão desde o momento do jejum até o descarregamento/espera dos animais para o abate. A finalidade primordial do jejum está em fazer com que os peixes consumam menos oxigênio, excretando menos amônia e gás carbônico, principalmente se forem transportados por um longo período de tempo até o abatedouro; como também para não haver evacuação de material fecal durante a manipulação da carcaça. Pesquisas mostram que esses animais quando mantidos em jejum toleram melhor processos considerados estressantes e que podem causar perdas na produção/venda: despesca, classificação, seleção e transporte para o abate (CHICRALA; SANTOS, 2013), porém não se sabe se o processo pode interferir diretamente na qualidade da carne do peixe. Além disso, a privação alimentar prolongada em peixes, pode causar brigas e, por consequência, ferimentos graves (PEDRAZZANI et al., 2008), debilitando o animal e servindo de porta de entrada para agentes oportunistas e patogênicos (ÁLVARES et al., 2008).

Outra etapa marcante é a insensibilização pré-abate, onde o animal sofrerá algum tipo de atordoamento para perder sua consciência e não sentir qualquer tipo de

dor ou sofrimento quando for abatido como, por exemplo, quando houver o corte das brânquias e a sangria. A insensibilização e o consequente abate ideal devem ser executados de maneira rápida e precisa, pois aqui deve ser levada em consideração a questão do bem-estar animal assim como gerar ao final um produto de alta qualidade, ou seja, sem manchas, escurecimento, excesso de muco, opacidade, fatores esses que indicam fase deteriorava do alimento (LINES et al., 2003).

Outro aspecto a ser destacado é quanto à etapa de sangria, sendo esta de grande importância para garantir a boa qualidade da carne no final do processamento. Para tal torna-se necessário a remoção do máximo possível de sangue da carcaça, uma vez que este sangue pode causar aparência desagradável, além de ser um meio de multiplicação de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos (LINES et al., 2003). Portanto, a sangria deve ser realizada logo após o atordoamento, qualquer que seja o método empregado.

Estudos que avaliaram o estresse em peixes durante procedimentos de insensibilização demorados e com reaplicações consecutivas demonstraram resultados negativos para a textura da carne devido o aumento da flacidez, além de reduzir a vida de prateleira do filé (BAHUAUD et al., 2010; LEFÈVRE et al., 2008), justamente porque técnicas e manejos pré-abate mal realizados estão presentes neste setor. Animais que foram estressados momentos antes do abate apresentaram entrada precoce ao estado de *rigor mortis*, e ocorreram maiores perdas de peso por descongelamento, quando comparados com animais não estressados (KIESSLING et al., 2004).

Países europeus vêm buscando adequações em abates de peixes, como no Reino Unido onde a preocupação com o bem-estar em trutas tem aumentado drasticamente, devido às exigências do mercado consumidor em adquirir peixes cultivados e abatidos de maneira humanitária (ROTH et al., 2007).

2.5.1 Sobre o jejum e a insensibilização

Estudos apontam que os peixes submetidos a jejum ideal para sua espécie se recuperam mais rapidamente do estresse da despesca, carregamento e transporte. Além disso, os peixes bem depurados entram nos tanques de transporte com o trato digestivo praticamente vazio e assim o impacto negativo do material fecal na qualidade da água

de transporte é minimizado, já que este aumenta a demanda de oxigênio, favorece o acúmulo de metabólitos tóxicos como a amônia e o CO₂ e aumenta a carga de micro-organismos na água, prejudicando a qualidade do transporte (LÓPEZ-LUNA; TORRENT; VILLARROEL, 2014; BITTENCOURT et al., 2013).

Alguns estudos (BALDISSEROTTO, 2002; GOMES et al., 2003; PAVILIDIS et al., 2002; NIE; CAO; FU, 2017; ALIX et al., 2017) avaliaram os efeitos da restrição alimentar em peixes por 24 a 48h antes do transporte até os frigoríficos, e os resultados encontrados nestes trabalhos diferem entre si, principalmente porque determinados fatores não foram considerados ou não explicitados. Um destes pode ser um fator logístico (em caso de transporte dos animais até o local de venda ou abate), pois um maior período de tempo onde são mantidos os peixes até a comercialização/abate pode estimular brigas e feridas por colisão, e tais dados não foram descritos. Em segundo lugar, a restrição alimentar prolongada pré-transporte poderia levar os peixes a um status nutricional debilitado, incidindo em menor imunidade e, por consequência, maiores mortalidades, principalmente em animais juvenis, e tal argumento também foi pouco explorado nos trabalhos.

Com relação à insensibilização, existe uma ampla variedade de métodos que podem ser utilizados na pesca ou na aquicultura, como a eletronarcole, percussão craniana, hipotermia ou asfixia ao ar ou por introdução de gases na água, sendo que cada um desses métodos pode induzir a diversos níveis de estresse (GRÄNS et al., 2016).

Os principais métodos de insensibilização de peixes, utilizados comercialmente, como asfixia ao ar e hipotermia, envolvem períodos extensos de sofrimento antes da morte (POLI et al., 2005) sendo então consideradas metodologias estressantes, mas a insensibilização por eletronarcole têm sido considerada humanitária devido à rápida perda de consciência e, aparentemente, não provoca um estresse prolongado (EFSA, 2004). No entanto, quando não aplicado corretamente (por erro no aparelho ou desconhecimento da espécie) pode comprometer a carcaça, diminuir o pH da carne ou acelerar o início do estado de *rigor mortis* (EFSA, 2004; KNOWLES et al., 2008).

Para manter a carne palatável e segura ao consumidor a aplicação de um método de insensibilização que permita preservar as características aparentes de um produto de qualidade, é primordial, já que o estresse pode interferir diretamente nesses aspectos,

mas que também ajude a prolongar a sua vida útil (KNOWLES et al., 2008) e por isso estudos e pesquisas no assunto são essenciais no aprimoramento dessa área.

Espera-se que este estudo contribua para futura elaboração de normativas sobre o tema, visto que não apenas o consumidor será beneficiado, mas o produtor preocupado em expandir seu negócio, alavancando assim mais um setor pecuário no Brasil.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIX, M. et al. Effects of fasting and re-alimentation on gill and intestinal morphology and indicators of osmoregulatory capacity in genetically selected sea bass (*Dicentrarchus labrax*) populations with contrasting tolerance to fasting. **Aquaculture**, v. 468, p. 314-325, 2017.

ÁLVAREZ, A.; GARCÍA GARCÍA, B.; GARRIDO, M.D.; HERNÁNDEZ, M.D. The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. **Aquaculture**, 284, 106–114. 2008.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - ANUALPEC. **ANUALPEC 2012**. São Paulo: FNP, 400 p. 2012.

ARANTES, M. K. Otimização de processos de obtenção de quitosana a partir de resíduo da carcinicultura para aplicações ambientais. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, 2, 34-47. 2013.

BAGNI, M.; CIVITAREALE, C.; PRIORI, A.; BALLERINI, A.; FINOIA, M.; BRAMBILLA, G.; MARINO, G.. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, 263, 52–60, 2007.

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

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Editora da UFSM, Santa Maria, 212p., 2002.

BANDEIRA, M.G.A., NASCIMENTO, J.S. Estudo prospectivo relativo à atividade da tilápia para a indústria de alimentos no período de 2006 a 2016. **Cad. Prospec.**, v. 10, n. 3 p. 552-562, 2017.

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

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ Comp Biol**, v.42, p.517-525, 2002.

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

BITTENCOURT, F.; NEU, D. H.; POZZER, R.; LUI, T. A.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R. Frequência de arraçamento para alevinos de carpa comum. **Boletim do Instituto de Pesca**, p. 149-156, 2013.

BLANCK, D. V. **Polimorfismo no íntron 1-PstI do gene do hormônio do crescimento em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2008. 141p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (**RIISPOA**), pescados e derivados 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda>>. Acesso em 10 dezembro de 2017.

CANDIDO, A.S.; MELO JÚNIOR, A.P.; SANTOS, C.H.D.A.; COSTA, H.J.M.S.; IGARASHI, M.A. Policultivo do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.9, p. 9-14, 2006.

CHICRALA, P. C. M. S.; SANTOS, V. R. V. Despesca e abate de peixes. In: EMBRAPA **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos** (p. 379-397). Embrapa, Brasil. 2013.

DAL PONT, G.; BOND, G.B.; BORGES, T.D.; BRAGA, J.S.; SANS, E.C.O.; DEUCHER, C.M.; MOLENTO, C.F.M. Impacto do manejo pré-abate sobre o bem-estar e a qualidade da carne da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (in press). **Livro de resumos do 17º Evento anual de Iniciação Científica da UFPR**. Editora UFPR, Curitiba, Brasil. 2009.

DINIZ, N. M.; HONORATO, C. A. Algumas alternativas para diminuir os efeitos do estresse em peixes de cultivo – Revisão. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 149-154. 2012.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. Welfare aspects of animal stunning and killing methods. **The European Food and Safety Authority Journal**, p.241, 2004.

FALCON, D.R.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; SOLARTE, W.V.N.; GUIMARÃES, I.G. Leucograma da tilápia do Nilo arraçada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.543 551, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture: contributing to food security and nutrition for all**. Roma: FAO. 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO. 2014.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and Aquaculture: meeting the sustainable development goals**. 227p. Rome, 2018.

FITZSIMMONS, K. Tilápia: The most important aquaculture species of the 21st century. In: V Internacional Symposium of tilapia in aquaculture, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, p.3-8., 2000.

GALHARDO, L.; OLIVEIRA, R. Dos peixes e dos homens: O estudo do bem estar animal aplicado à piscicultura. **Anais da Zootec** 2005, Campo Grande MS, 2005.

GOMES, L. C. et al. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 283-290, fev. 2003.

GRÄNS, A. et al. Stunning fish with CO₂ or electricity: contradictory results on behavioural and physiological stress responses. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 10, n. 2, p. 294-301, 2016.

HÅSTEIN, T., SCARFE, A.D., LUND, V.L. Science based assessment of welfare: aquatic animals. In Animal welfare: global issues, trends and challenges. **Review Scientific and Technical of the Office Epizootics**, v. 24, n.2, p 529–547, 2005.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre as tilápias. In: RIBEIRO, R.P., HAYASHI, C., FURUYA, W.M. (Eds.) **Curso de piscicultura-Criação racional de tilápias**. p.4, 1995.

HUNTINGFORD, F.A., KADRI, S. Defining, assessing and promoting the welfare of farmed fish. **Review Scientific and Technical of the Office Epizootics**. v.33, n.1, p. 233-244, 2014.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 05 jan. 2019.

KIESSLING, A.; ESPE, M.; RUOHONEN, K.; MORKORE, T. Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter isoeugenol or CO₂ anaesthesia. **Aquaculture**, v. 236, p.645–657. 2004.

KNOWLES, T.G.; BROWN, S.N.; WARRISS, P.D.; LINES, J., TINARWO, A.; SENDON, M. Effect of electrical stunning at slaughter on the quality of farmed turbot (*Psetta maxima*). **Aquac Res**, 39: 1731-1738. 2008.

KOBERSTEIN, T. C. R. D.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Comportamento alimentar de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) por meio das observações do tempo de retorno do apetite e do tempo de saciação dos peixes em duas temperaturas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 3, p. 339-344, 2004.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiá, SP. 285p., 2000.

KUBITZA, F.O. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.21, p.1019, 2011.

LEFÈVRE, F.; BUGEON, J.; AUPERIN, B.; AUBIN, J. Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. **Aquaculture** 284, 81– 89. 2008.

LINES, J.A. et al. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. **Aquacultural Engineering**, v.28, p.141-154, 2003.

LINES, J.A.; SPENCE, J. Safeguarding the welfare of farmed fish at harvest. **Fish Physiol. Biochem.** 38, 153–162. 2012.

LOPES, F. S. C. **Desempenho produtivo e econômico do pirarucu (*Arapaima gigas*) em diferentes sistemas de alimentação proteicos**. 54 f. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Pesca) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Presidente Médici. 2015.

LÓPEZ-LUNA, J.; TORRENT, F.; VILLARROEL, M. Fasting up to 34 °C days in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has little effect on flesh quality. **Aquaculture**. 420–421, 63–70. 2014.

LÓPEZ-LUNA, J.; VÁSQUEZ, L., TORRENT, F.; VILLARROEL, M. Short-term fasting and welfare prior to slaughter in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** 400, 142–147. 2013.

LOVSHIN, L.L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1, Piracicaba, 1997. **Anais...** Piracicaba: CBNA, p.137-164, 1997.

MARTINS, C. I. M., GALHARDO, L., NOBLE, C., DAMSGARD, B., SPEDICATO, M.T., ZUPA, W., BEAUCHAUD, M., KULCZYKOWSKA, E., MASSABUAU, J.C., CARTER, T., PLANELLAS, S.R. Behavioural indicators of welfare in farmed fish. **Fish Physiology Biochemistry**, v.38, n.1, p. 17–41, 2012.

MOBERG, G.P. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. **The biology of Animal Stress: Basic principles and implications for animal welfare**. California: CABI Publishing, 1- 22p. 2000

MOLENTO, C.F.M. Bem-estar e produção animal: aspectos econômicos – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 1-11. 2005.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatística da Pesca e Aquicultura**, 2012 - 2014. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/>> Acesso em 15 de maio, 2017.

MUELBERT, B.; WEINGARTNER, M.; SADO, R. Y.; FERRARI, F.; BORBA, M. R. Desempenho de peixes em policultivo com ração orgânica e convencional. **Cadernos de Agroecologia**, 13(1). 2018.

NIE, LI-JUAN; CAO, ZHEN-DONG; FU, SHI-JIAN. Digesting or swimming? Integration of the postprandial metabolism, behavior and locomotion in a frequently foraging fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 204, p. 205-210, 2017.

NOGA, E. Fish leukocyte responses. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. **Veterinary hematology**, (Ed. Fifth). P.436-439. 2000.

NOGUEIRA, A. J. **Aspectos da Biologia reprodutiva e padrões de crescimento da Tilápia *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758, (Linhagem Chitralada) em cultivos experimentais**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2003.

PAVILIDIS, M. et al. Evaluation of transportation procedures on water quality and fry performance in red porgy (*Pagrus pagrus*) fry. **Aquaculture**, Crete, Italy, n. 218, p.187-202, 2002.

PEDRAZZANI, A.S., OSTRENSKY, A., CARNEIRO, P.C.F., GAYER, M.V., MOLENTO, C.F.M. Opinião pública e educação sobre abate humanitário de peixes no município de Araucária, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 976-983, 2008.

PEIXE BR. **ANUARIO PeixeBR da Piscicultura 2019**, São Paulo, 2019.

POLI, B. M.; PARISI, G.; SCAPPINI, F.; ZAMPACAVALLLO, G. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter an slaughter management. **Aquaculture International**, v.13, p.29-49, 2005.

RAHMANIFARAH, K.; SHABANPOUR, B; SATTARI, A. Effects of clove oil on behavior and flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio*) in comparison with pre-slaughter CO2 stunning, chilling and asphyxia. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 11:139-147, 2011.

RIBAS, L.; FLOS, R.; REIG, L.; MACKENZIE, S.; BARTON, B.A.; TORT, L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality. **Aquaculture**, v. 269, p. 250–258. 2007.

ROBB, D.H.F., KESTIN, S.C., WARRISS, P.D. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. **Aquaculture**, v.182, 2000.

ROTH, B. et al. Slaughter quality and rigor contraction in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*); a comparison between different stunnig methods. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, p. 754-761, 2007.

ROUBACH, R. et al. Aquaculture planning, development in Brazilian federal waters. **Global Aquaculture Advocate**, July/Aug. 2015.

SANTOS, E.C.B. **Métodos de abate e qualidade da Tilápia**. Tese de doutorado. Centro de aquicultura UNESP. Universidade Estadual Paulista. 100pp. 2013.

SANTOS, E.L. et al. Digestibilidade de subprodutos da mandioca para a tilápia do Nilo. **R. Bras. Ciên. Agrár.** v. 4, p.358-362. 2009.

SKJERVOLD, P.O., FJAERA, S.O., SNIPEN, L. Predicting live-chilling dynamics of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.209, p.185–95, 2002.

SNEDDON, L. U. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Applied Animal Behaviour Science**, v.83, p.153–62, 2003.

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 67, n. 2-3, p. 117-124, 2005.

SUBASINGHE, R.P.; BONDAD-REANTASO, M.G.; MCGLADDERY, S.E. Aquaculture development, health and wealth. In: Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., McGladdery, S.E. (Eds.), **Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium**, Bangkok, Thailand, February 20–25, 2000, NACA, Bangkok and FAO, Rome, pp. 167–191. 2001.

TAVARES, G.C.; PALHARES, M.M. Epidemiologia, diagnóstico e controle das principais bacterioses que afetam a tilapicultura no Brasil. **Revista veterinária e zootecnia em Minas**, v.12, p.34.39, 2011.

URBINATI, E.C; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P. et al. **Tópicos especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArt, 171-194p. 2004.

VANNUCCINI, S. El enfoque del nuevo mercado de tilapia e nel mundo Occidental. **Panorama Acuicola**, v.4, n.3, p.22-25, 1999.

VIEIRA FILHO, J. E. R.; FISHLOW, A. **Agricultura e indústria no Brasil: inovação e competitividade**. Brasília: Ipea, 2017.

VOLPATO, G.L.; GONÇALVES, F.; CASTILHO, M.F. Insight into the concept of fish welfare. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.75, p.165-171, 2007.

WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.; MC LEAY, D. Stress and acclimation. In: Schereck C, Moyle P. (Ed.). **Methods for fish biology**. Bethesda, MD: **American Fisheries Society**, p. 451-489. 1990.

WENDEELAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiol Rev**, v.77, p.591-625, 1997.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Este estudo objetivou avaliar os efeitos dos diferentes tempos de jejum e diferentes métodos de insensibilização pré-abate sobre os parâmetros biológicos, bioquímicos e de qualidade de carne em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos de diferentes períodos de jejum (0, 24, 48, 72 horas) e insensibilizações (hipotermia e eletronarcose) em tilápias do Nilo, por meio de parâmetros biológicos; bioquímicos e de qualidade de carne mantidas durante 7 dias sob refrigeração;
- Avaliar os efeitos de diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 horas) e insensibilizações (hipotermia e eletronarcose) por meio de parâmetros hematológicos e bioquímicos, sobre o bem-estar de tilápias do Nilo;
- Avaliar os efeitos de diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 horas) e insensibilizações (hipotermia e eletronarcose), por meio de parâmetros relacionados à qualidade de carne mantida durante 14 dias sob refrigeração;
- Avaliar os efeitos de diferentes jejuns (0, 24, 48 horas) e insensibilizações (hipotermia e eletronarcose) por meio de parâmetros relacionados à qualidade de carne mantida durante 120 dias sob congelamento.

CAPÍTULO 1.

EFEITO DE DIFERENTES MANEJOS PRÉ-ABATE SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DA QUALIDADE DE FILÉS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) MANTIDOS REFRIGERADOS

RESUMO

Procedimentos de pré-abate como jejum e insensibilização são fatores estressantes aos peixes e podem induzir a uma resolução precoce do *rigor mortis*, degradando mais rápido o produto final. O presente estudo teve por objetivo analisar o efeito dos diferentes períodos de jejum combinados a métodos de insensibilização pré-abate, sobre as alterações bioquímicas e da qualidade de carne de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tilápias (n = 48) foram submetidas à exposição a diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 e 72 horas) e posteriormente insensibilizadas por hipotermia ou eletronarcose. As tilápias foram abatidas e então submetidas a análises de sangue (glicose e lactato), *rigor mortis*, pH, medidas dielétricas (através do Freshness Meter) e determinação de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e dos seus produtos de degradação, sendo os filés posteriormente armazenados durante 7 dias sob refrigeração. O delineamento estatístico foi realizado em esquema fatorial sendo 4 (períodos de jejuns) x 2 (insensibilizações) e dez pontos amostrais (0, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas) referentes aos filés submetidos as análises bioquímicas. Todos os dados foram submetidos a ANOVA e quando constatada diferença significativa ($p < 0,05$) as médias foram então comparadas pelo teste de Tukey. Menores valores de glicose e lactato foram encontrados no tratamento submetido ao jejum de 72h/hipotermia, indicando que a supressão alimentar associado a uma insensibilização demorada incidem no controle da osmorregulação de tilápias. Houve uma rápida entrada e saída do *rigor mortis* no tratamento jejum de 72h/hipotermia e eletronarcose, indicando que a falta de componentes energéticos no músculo influencia nessa análise. Foram encontrados também menores concentrações de ATP e maiores concentrações de Hx nos mesmos, indicando que essas metodologias pré-abate influenciam nas alterações autolíticas sofridas no músculo. Conclui-se que o jejum mais prolongado (72 horas) aplicado durante o teste, associado a uma insensibilização demorada (hipotermia) tem efeito deletério sobre o metabolismo da tilápia e pode carrear a uma rápida deterioração do produto final.

Palavras-chave: Insensibilização; Períodos de jejum; Qualidade da carne.

ABSTRACT

Pre-slaughter procedures such as fasting and numbing are stressful to fish and may induce early resolution of *rigor mortis*, degrading the final product faster. The aim of this study was to analyze the effect of different fasting periods combined with pre-slaughter stunning methods on the biochemical and meat quality changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Tilapia (n = 48) were exposed to different fasting periods (0, 24, 48 and 72 hours) and later numb by hypothermia or electronarcosis. Tilapia were

slaughtered and then submitted to blood (glucose and lactate), *rigor mortis*, pH, dielectric measurements (through Freshness Meter) and adenosine-5'-triphosphate (ATP) and its degradation products. the fillets were later stored for 7 days under refrigeration. The statistical design was performed in a factorial scheme with 4 (fasting periods) x 2 (numbness) and ten sampling points (0, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours) referring to the fillets submitted to the biochemical analyzes. All data were submitted to ANOVA and when significant difference ($p < 0.05$) was found the means were then compared by Tukey test. Lower glucose and lactate values were found in the 72h fasting / hypothermic treatment, indicating that food suppression associated with delayed numbness affects the control of tilapia osmoregulation. There was a rapid entry and exit of rigor mortis in the 72h fasting / hypothermia and electronarcosis treatment, indicating that the lack of energetic components in the muscle influences this analysis. Lower ATP concentrations and higher Hx concentrations were also found, indicating that these pre-slaughter methodologies influence the autolytic changes suffered in the muscle. It is concluded that the prolonged fasting (72 hours) applied during the test, associated with a long numbness (hypothermia) has a deleterious effect on tilapia metabolism and may lead to a rapid deterioration of the final product.

Keywords: Stunning; Fasting periods; Quality of meat.

1. INTRODUÇÃO

As operações pré-abate envolvem procedimentos diversificados desde o jejum, a captura, o transporte, até o recebimento pelo frigorífico. Mesmo que sejam poucas as informações referentes às perdas durante as operações realizadas no pré-abate sabe-se que esta fase é um fator decisivo na otimização dos processos, tendo em vista que é durante essa etapa da produção que os peixes são submetidos a níveis de estresse que podem resultar em perdas na qualidade final da carne ou até mesmo levar os peixes à morte antes do abate final (HULTMANN et al., 2012).

Dentre as atividades mais importantes do pré-abate está a aplicação do jejum para favorecer o processo de despesca, classificação, seleção e transporte para o abate (MOLENTO, 2005; WONG et al., 2003). O tempo de jejum aplicado varia em peixes adultos de 24 até 120 horas para a maioria das espécies (sendo estendido esse tempo maior para espécies marinhas), porém sabendo das particularidades fisiológicas de cada uma deve haver mais estudos sobre a precisão do controle desse tempo (WONG et al., 2003).

As consequências da privação alimentar prolongada em peixes podem levar a desestabilização da hierarquia do cardume aumentando as brigas, levando a corrosão da nadadeira dorsal (devido justamente as brigas e ao canibalismo), perda de peso, desequilíbrio da homeostase e aumento do estresse (NIE et al., 2017). O jejum também

causa efeitos específicos no metabolismo dos peixes, pois dependendo do tempo aplicado, determinados tecidos podem mobilizar as reservas metabólicas, afetando a quantidade armazenada e sua disponibilidade; nesse sentido, o jejum pode exercer influência substancial em eventos (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995). Sendo assim, observa-se que o jejum em peixes é uma etapa comumente utilizada por produtores e proprietários de frigoríficos, mas poucas pesquisas apontam melhor tempo para cada espécie e seu efeito direto sobre a qualidade final da carne em peixes (KOBBERSTEIN et al., 2004).

Para manter a qualidade do pescado a insensibilização é outro ponto crucial dentro da fase pré-abate, pois o estresse de cada metodologia pode induzir a redução das reservas de glicogênio, além de aumentar o nível de ácido lático da musculatura dos peixes, diminuindo o pH da carne, acelerando a degradação do pescado pela liberação de enzimas proteolíticas (RIBAS et al., 2007; ROBB et al., 2000). Apesar de já estarem sendo aplicadas algumas metodologias de insensibilização como a imersão em água e gelo, eletricidade, narcose por gases e atordoamento percussivo (GRÄNS et al., 2016), não há no Brasil uma legislação vigente e específica de insensibilização em peixes como existe para as carnes bovinas, suínas e de aves, visando melhores condições para o bem-estar animal e qualidade da matéria-prima. Além da questão relacionada à qualidade do produto final, as considerações sobre o bem-estar dos peixes no momento do abate deveriam estar sempre presentes de forma a conscientizar toda a população e produtores que é possível abater os peixes em condições humanitárias.

Para que ocorra a insensibilização aparente de forma eficiente, cada método deve ser avaliado considerando-se cada espécie de peixe e todas as variáveis envolvidas. Por exemplo, para a eletronarcose há uma série de variáveis a serem calculadas e testadas, como a definição dos parâmetros da corrente elétrica que possam assegurar a insensibilização adequada. Além disso os equipamentos de choque elétrico devem ser concebidos e utilizados especificamente para determinadas espécies de peixes e de seus ambientes; e os manipuladores devem se atentar no fato de que a perda de consciência que ocorre após a insensibilização causada por eletrocussão pode ser reversível (RIBAS et al., 2007; ROTH et al. 2007; TINARWO, 2006). Com tantos pontos a serem reavaliados se faz necessários maiores estudos quanto a essa metodologia, que vem sendo demonstrada como a de melhor aplicabilidade já que resulta positivamente em aspectos relacionados ao bem-estar dos peixes (NGUYEN et al., 2018).

Não existem informações conclusivas sobre o melhor período de jejum associado ao melhor método de insensibilização para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que

seja, ao mesmo tempo, menos estressante e que proporcione melhor qualidade de carne. Vale ressaltar que essa espécie se destaca como sendo o principal peixe de água doce criado no Brasil, visto a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (CONTE et al., 2008), além de ser a espécie de grande preferência de consumo da população em geral (COSTA-BRAGA et al., 2019). O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes períodos de jejum combinados a métodos de insensibilização pré-abate, sobre as alterações da bioquímica e da qualidade de carne de tilápia do Nilo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho teve aprovação do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Pirassununga – SP, sob o protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IBAMA registrada no processo 02031.01021/2016-94 e pelo CEUA da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), sob o protocolo no. 7758310817.

2.1 Amostragem e procedimento experimental

Foram utilizadas 48 tilápias do Nilo adultas com peso médio de $671,83 \pm 117,73$ g e comprimento médio de $33,00 \pm 1,88$ cm. Os peixes foram transportados vivos de uma piscicultura próxima à cidade de Pirassununga – São Paulo, Brasil, distribuídos em quatro lotes ($n = 12$) e alojados em quatro tanques de concreto com capacidade de 2400 litros cada e com renovação constante de água, no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Pirassununga – SP.

Os animais foram alimentados com ração comercial duas vezes ao dia e após a aclimação de dez dias cada lote de peixes foi submetido a um diferente período de jejum; 0, 24, 48, 72h, respectivamente; e posteriormente seis animais de cada lote foram submetidos a dois métodos de insensibilização sendo: (1) hipotermia - exposição dos animais a solução de água e gelo na proporção 1:1 e (2) eletronarcose - exposição dos animais a corrente elétrica de 220 volts, 60 Hz, 4,8 amperes por 5s.

A aparente insensibilização foi avaliada pela ausência de reflexos ao estímulo da linha lateral, observações de natação e do equilíbrio, ausência de comportamento de fuga,

movimentação do opérculo e pela ausência do reflexo vestibulo-ocular, de acordo com o protocolo proposto por Kestin, Van des Vis e Robb (2002). Foram avaliados os parâmetros da qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade) com o auxílio da sonda multi-parâmetro Horiba (modelo U-10), antes e após a insensibilização das tilápias expostas aos tratamentos. Em seguida as tilápias foram abatidas por meio do corte das brânquias, por sangria em água gelada e filetadas, sendo este material submetido às análises laboratoriais. A Figura 1 apresenta maiores detalhes das metodologias de insensibilização aplicadas.

Figura 1- Figura A1 - insensibilização por hipotermia, sendo controlado o tempo assim como os reflexos e sentidos sensoriais das tilápias. Em A2 - aplicação da hipotermia. Em B - posicionamento dos fios e placas que insensibilizaram, por corrente elétrica, os peixes.

2.2 Procedimentos pós-abate e análises laboratoriais

As operações pré-abate envolvem procedimentos diversificados desde o jejum, a captura, o transporte, até o recebimento pelo frigorífico. Mesmo que sejam poucas as informações referentes às perdas durante as operações realizadas no pré-abate sabe-se que esta fase é um fator decisivo na otimização dos processos, tendo em vista que é durante essa etapa da produção que os peixes são submetidos a níveis de estresse que podem resultar em perdas na qualidade final da carne ou até mesmo levar os peixes à morte antes do abate final (HULTMANN et al., 2012).

Dentre as atividades mais importantes do pré-abate está a aplicação do jejum para favorecer o processo de despesca, classificação, seleção e transporte para o abate (MOLENTO, 2005; WONG et al., 2003). O tempo de jejum aplicado varia em peixes adultos de 24 até 120 horas para a maioria das espécies (sendo estendido um tempo maior

para espécies marinhas), porém sabendo das particularidades fisiológicas de cada uma deve haver mais estudos sobre a precisão do controle desse tempo (WONG et al., 2003).

As consequências da privação alimentar prolongada em peixes podem levar a desestabilização da hierarquia do cardume aumentando as brigas, levando a corrosão da nadadeira dorsal (devido justamente as brigas e ao canibalismo), perda de peso, desequilíbrio da homeostase e aumento do estresse (NIE et al., 2017). O jejum também causa efeitos específicos no metabolismo dos peixes, pois dependendo do tempo aplicado, determinados tecidos podem mobilizar as reservas metabólicas, afetando a quantidade armazenada e sua disponibilidade; nesse sentido, o jejum pode exercer influência substancial em eventos (NAVARRO; GUTIÉRREZ, 1995). Sendo assim, observa-se que o jejum em peixes é uma etapa comumente utilizada por produtores e proprietários de frigoríficos, mas poucas pesquisas apontam melhor tempo para cada espécie e seu efeito direto sobre a qualidade final da carne em peixes (KOBBERSTEIN et al., 2004).

Para manter a qualidade do pescado a insensibilização é outro ponto crucial dentro da fase pré-abate, pois o estresse de cada metodologia pode induzir a redução das reservas de glicogênio, além de aumentar o nível de ácido lático da musculatura dos peixes, diminuindo o pH da carne, acelerando a degradação do pescado pela liberação de enzimas proteolíticas (RIBAS et al., 2007; ROBB et al., 2000). Apesar de já estarem sendo aplicadas algumas metodologias de insensibilização como a imersão em água e gelo, eletricidade, narcose por gases e atordoamento percussivo (GRÄNS et al., 2016), não há no Brasil uma legislação vigente e específica de insensibilização em peixes como existe para as carnes bovinas, suínas e de aves, visando melhores condições para o bem-estar animal e qualidade da matéria-prima. Além da questão relacionada à qualidade do produto final, as considerações sobre o bem-estar dos peixes no momento do abate deveriam estar sempre presentes de forma a conscientizar toda a população e produtores que é possível abater os peixes em condições humanitárias.

Para que ocorra a insensibilização aparente de forma eficiente, cada método deve ser avaliado considerando-se cada espécie de peixe e todas as variáveis envolvidas. Por exemplo, para a eletronarcose há uma série de variáveis a serem calculadas e testadas, como a definição dos parâmetros da corrente elétrica que possam assegurar a insensibilização adequada. Além disso os equipamentos de choque elétrico devem ser concebidos e utilizados especificamente para determinadas espécies de peixes e de seus

ambientes; e os manipuladores devem se atentar no fato de que a perda de consciência que ocorre após a insensibilização causada por eletrocussão pode ser reversível (RIBAS et al., 2007; ROTH et al. 2007; TINARWO, 2006). Com tantos pontos a serem reavaliados se faz necessários maiores estudos quanto a essa metodologia, que vem sendo demonstrada como a de melhor aplicabilidade já que resulta positivamente em aspectos relacionados ao bem-estar dos peixes (NGUYEN et al., 2018).

Não existem informações conclusivas sobre o melhor período de jejum associado ao melhor método de insensibilização para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que seja, ao mesmo tempo, menos estressante e que proporcione melhor qualidade de carne. Vale ressaltar que essa espécie se destaca como sendo o principal peixe de água doce criado no Brasil, visto a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento (CONTE et al., 2008), além de ser a espécie de grande preferência de consumo da população em geral (COSTA-BRAGA et al., 2019). O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes períodos de jejum combinados a métodos de insensibilização pré-abate, sobre as alterações da bioquímica e da qualidade de carne de tilápia do Nilo.

O Índice de Rigor Mortis (IRM) foi determinado em cada ponto amostral de acordo com Bito et al. (1983) e calculado por meio da equação: $IRM = [(Do - D)/Do] \times 100$, onde: Do = valor da distância que separa a base da nadadeira caudal ao ponto de referência, imediatamente após a morte e D = valor da distância que separa a base da nadadeira caudal ao ponto de referência nos intervalos de tempos selecionados. O pH foi medido diretamente no músculo do peixe na região dorsal, utilizando um peagâmetro de punção portátil (Sentron 1001 Integrated Sensor Technology). Com o auxílio do equipamento Fish Freshness Meter – Distrell's Torrymeter®, realizaram-se as medidas dielétricas.

As concentrações de ATP e seus produtos de degradação (adenosina difosfato – ADP, adenosina-monofosfato - AMP, monofosfato de inosina - IMP, inosina - INO e hipoxantina – Hx) foram determinadas em porções do músculo dorsal das tilápias. Em cada período amostral foi retirado 1 g de músculo na parte dorsal de três filés esquerdos de cada tratamento. O músculo foi homogeneizado com 10mL de solução de ácido perclórico 0,6M com o auxílio do ultraturrax (IKA-T25) por 20 segundos a 18.000 rpm. A solução foi filtrada em papel filtro (Whatman nº1) e 600µL do filtrado foi retirado e

adicionado a 600µL de solução tampão fosfato (pH 7,6) dentro de microtubos tipo eppendorfe, os quais foram centrifugados por 3 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer para o momento da análise. A análise foi realizada de acordo com Burns, Kee, Irvine (1985), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC). Os padrões utilizados para obter o tempo de retenção de cada metabolito foram adquiridos na forma purificada (Sigma Aldrich). O volume exato a ser injetado na coluna variou de acordo com a melhor visualização dos picos (25, 50 e 100 µl). O valor K, que expressa o estado de degradação, foi calculado de acordo com Saito et al. (1959) pela seguinte equação:

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

2.3 Análise estatística

Para as análises do sangue, as variáveis foram expressas por meio da média e desvio padrão, e submetidas à análise de variância simples ($p < 0,05$) e quando houve diferença significativa entre os tratamentos as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para as análises de qualidade da carne foi utilizado um esquema fatorial sendo 4 (períodos de jejuns) x 2 (insensibilizações) e dez pontos amostrais (0, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas); os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com desdobramento de interação entre tratamento x tempo, com nível de significância a 5%. Utilizou-se o Programa MINITAB® versão 14.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de qualidade da água e do tempo de insensibilização dos peixes estão apresentados na Tabela 1. A qualidade de água manteve-se estável durante a aplicação do jejum (pH: 6,52, oxigênio dissolvido [OD]: 9,0 mg.L⁻¹, temperatura 24,2°C) e no decorrer do experimento os valores de pH e OD mantiveram-se estáveis durante toda a aplicação da corrente elétrica e dentro do esperado para a água utilizada nos tratamentos. A salinidade observada no tratamento de eletronarcose (0,02%) ocorreu devido a dissolução de NaCl comercial na água onde os peixes foram imersos para a aplicação da

corrente, com o intuito de melhorar a condutividade elétrica, aumentando assim a eficácia do tratamento.

Tabela 1 - Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade de água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) antes e após a aplicação das insensibilizações nas tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum.

Jejum	Insensibilização	Tempo de insensibilização	OD (mg/L)	Temperatura (°C)	Condutividade (μ /cm)	pH	Salinidade (%)
			Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização
Jejum 0h	Hipotermia	17 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,133/0,106	6,11/6,08	0/0
	Eletronarcose	5s	8,54/8,59	23,3/23,5	0,712/0,738	7,00/7,00	0,02/0,02
Jejum 24h	Hipotermia	17 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,136/0,109	6,19/6,16	0/0
	Eletronarcose	5s	8,59/8,59	23,4/23,4	0,733/0,733	6,89/6,89	0,02/0,02
Jejum 48h	Hipotermia	18 min	19,99/19,99	1,2/1,4	0,115/0,127	6,17/6,14	0/0
	Eletronarcose	5s	8,54/8,59	24,4/24,5	0,728/0,647	7,03/7,03	0,02/0,02
Jejum 72h	Hipotermia	18 min	19,99/19,99	1,2/1,5	0,091/0,081	6,17/6,14	0/0
	Eletronarcose	5s	8,47/8,47	24,6/24,7	0,711/0,713	7,02/7,02	0,02/0,02

Foi observado que houve um aumento de um minuto para o procedimento de insensibilização por hipotermia nos grupos submetidos ao jejum 48 e 72 horas, apesar disso aparentemente não ter causado um efeito significativo ($p>0,05$). Possivelmente como os animais já estavam submetidos a um efeito estressor crônico, ausência de alimento por um período prolongado de horas, a fisiologia do peixe em uma tentativa de manter a homeostase induz a uma maior resistência quando submetido a mais um efeito estressor agudo, no caso a insensibilização. Esse pode ser mais um exemplo do efeito denominado como Síndrome Geral de Adaptação apontado por Selye (1950, 1973) que considerou uma série de respostas ao estresse (tanto de origem ambiental como também de origem química), tendo três etapas: a reação de alarme (foi observado que os peixes do grupo de jejum 48 e 72 horas ao final do experimento estavam mais agitados durante o momento da captura), resistência (observado então a resistência fisiológica até a total insensibilização) e exaustão (condição patológica ou morte do animal não observado no experimento).

No presente estudo houve diferença ($p<0,05$) nos níveis de glicose plasmática pré-abate (Fig. 2) observando-se diminuição com o aumento do período de jejum. O menor

valor encontrado foi o do tratamento jejum 72h/hipotermia ($20,03 \pm 2,9 \text{ mg/dL}$) e indicando um possível quadro de hipoglicemia.

A glicose plasmática é um dos mais importantes indicadores utilizados nas pesquisas para diagnosticar a ocorrência de estresse fisiológico (BARCELLOS et al., 2010). Com o estresse causado pela supressão alimentar, como aplicado nesse experimento, pode ter ocorrido a ativação de dois eixos neuroendócrinos: o eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC), que resulta na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) como produtos finais; e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) que libera os corticosteroides (cortisol e cortisona) (CASTRO; FERNANDES, 2009). Ambos os eixos interagem com o metabolismo e a osmorregulação em peixes e dessa forma a ação destes hormônios em diversos órgãos-alvo resulta em modificações bioquímicas e fisiológicas denominadas respostas secundárias ao estresse (WANG et al., 2009). Uma dessas respostas pode ter sido a mobilização e estocagem de substratos energéticos, como a glicose, a determinados órgãos-alvo conforme aumento das horas do período de jejum. Barcellos e colaboradores (2010) estudaram os efeitos hormonais de cortisol e glicogênio em *Rhamdia quelen* por um período de até 21 dias havendo retorno da alimentação ao final do experimento e concluíram que o esgotamento precoce e extenso de glicogênio hepático nos peixes submetidos ao jejum sugeriu que essa é uma fonte de energia primária em períodos de restrição alimentar, talvez o mesmo mecanismo ocorra em tilápias.

Figura 2 – Concentrações de glicose e lactato sanguíneo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronnarcose. *Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados.

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) (Fig. 2) para a concentração de lactato plasmático. Índices de menores valores foram encontrados nos tratamentos jejum 72h/hipotermia ($2,54 \pm 0,25$ mmol/L) e jejum 72h/eletroanestesia ($3,17 \pm 0,16$ mmol/L). Possivelmente, a deficiência respiratória provocada pela aplicação da hipotermia (dificuldade dos animais de locomoverem na caixa devido ao gelo) associada ao tempo de exposição utilizado nesse trabalho, pode ter induzido a alguma dificuldade respiratória e causado mais um fator de estresse agravante nas tilápias.

Já os níveis de lactato plasmático encontrados neste trabalho podem estar relacionados ao efeito direto causado pela insensibilização. Em experimentos com supressão de oxigênio, durante períodos de 12h de exposição à hipóxia os peixes apresentam níveis de cortisol e de lactato plasmático alterados e quando o peixe retorna à normóxia os níveis desses parâmetros também retornam, em menos de 6h. Neste trabalho observou-se baixa concentração quando aplicado um jejum prolongado (72 horas) e uma insensibilização que afeta a corrente elétrica do animal por meio da temperatura (hipotermia), assim como induziu a uma hipóxia intermitente. Domenici et al. (2017); Wang et al. (2018); Seth et al. (2013) apontaram que a insensibilização por hipotermia induz a um processo de hipóxia, e que quando intermitente causam efeitos deletérios na resposta imunológica e microbiológica do peixe e podem comprometer a qualidade do filé, tanto de peixes de águas temperadas quanto de peixes de águas tropicais.

Na Tabela 2 está apresentada a evolução do *rigor mortis* que teve diferenças significativas ($p < 0,05$) para os tempos de estocagem e para os tratamentos. Inicialmente entre os oito tratamentos foi possível observar um comportamento dos dados semelhante ao longo do tempo. Aos dois dias de estocagem, todos os peixes encontravam-se em *rigor mortis* pleno e esse estado permaneceu até o final do período, com exceção para os tratamentos de jejum de 72h/hipotermia e eletroanestesia.

Tabela 2 – Índice de Rigor Mortis (IRM) em tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) refrigeradas por 7 dias.

Tratamentos	Jejum 0h		Jejum 24h		Jejum 48h		Jejum 72h	
Estocagem (h)	H ^A	E ^A	H ^A	E ^A	H ^A	E ^A	H ^B	E ^B
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
3	40,8±6,5 ^b	41,5±9,1 ^b	41,9±6,2 ^b	43,2±7,6 ^b	45,5±6,2 ^b	59,3±7,2 ^{bc}	57,8±5,1 ^b	56,5±5,2 ^b
6	61,9±5,2 ^c	61,8±4,9 ^c	68,4±2,3 ^c	76,5±2,2 ^c	80,2±5,2 ^c	72,3±7,8 ^c	89,5±2,5 ^c	72,3±3,5 ^c
24	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
48	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
72	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
96	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
120	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
144	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d
168	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	100 ^d	92,1±7,9 ^e	94,5±3,5 ^e

Valores são médias das triplicatas por grupo $\pm$ EP. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de exposição ao mesmo tratamento; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Em 24 horas todas as amostras se encontravam em rigor pleno indicando que este é o período em que todos os efeitos dos tratamentos interferem diretamente na mudança da consistência (textura) da carne, passando o peixe inteiro de macio e flexível para rígido e inflexível. Observou-se também que nas primeiras 24 horas de análise houve o início precoce do *rigor mortis* das amostras jejum 48h e 72h/hipotermia e eletronarcose; além disso, os grupos jejum 72h/hipotermia e jejum 72h/eletronarcose foram as primeiras a apresentarem sinais de pós-rigor, saindo do rigor pleno às 168 horas de análise. Tal acontecimento indica possivelmente que os peixes quando não são alimentados por períodos maiores antes da insensibilização e abate entram e saem do *rigor mortis* precocemente, justamente por haver falta de componentes energéticos estocados no músculo (JONES et al., 2012). Portanto, o período de maior jejum (72 horas) a que foram submetidos os peixes, teve influência direta no tempo de entrada, permanência e saída do *rigor mortis*.

Em estudo com *Dicentrarchus labrax*, Acerete et al. (2009), compararam procedimentos de abate (asfixia, CO₂ e asfixia em gelo), e observaram que a instalação do rigor mortis foi semelhante nos três métodos testados, sendo que alguns indivíduos asfixiados com gelo entraram no estado de rigor pleno mais rapidamente. Este fato provavelmente ocorreu devido ao alto consumo de energia do ATP em etapas que antecedem o abate, como a hipotermia que é um processo lento, demorado e que expõem os peixes ao estresse, influenciando diretamente o índice de rigor mortis. Neste trabalho

observou-se que os IRM dos grupos em jejum 72h insensibilizados por hipotermia, também apresentaram comportamento similar ao descrito.

Para a variável pH muscular (Tabela 3) houve diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os tratamentos submetidos ao jejum, sendo que os tratamentos que não foram submetidos a restrição alimentar (tanto em hipotermia como em eletronarcose) tiveram um declínio dos valores somente após 96 horas de análise. Já nos tratamentos submetidos a jejuns associado à hipotermia, observou-se que as amostras sofreram um rápido declive nos valores de pH. Apesar disso, todas as amostras (incluindo o jejum 72h/hipotermia que apresentou menor valor de pH ao final do período estudado ($6,08 \pm 0,05$) dentro dos 7 dias de análises, apresentaram valores considerados ideais para comercialização de pescado na categoria fresco, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 2001), que estabelece como limite máximo de pH para pescado fresco 6,5 na carne interna. Ainda alguns autores complementam que essa faixa de frescor varia de 6 a 6,8 (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Tabela 3 –Valores de pH muscular de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tipos de jejum e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) refrigeradas por 7 dias.

Tratamentos	Jejum 0h		Jejum 24h		Jejum 48h		Jejum 72h	
Estocagem (h)	H ^A	E ^A	H ^A	E ^A	H ^{AB}	E ^{AB}	H ^B	E ^B
0	6,63±0,02 ^a	6,72±0,05 ^a	6,82±0,07 ^a	6,69±0,05 ^a	6,71±0,06 ^a	6,72±0,07 ^a	6,64±0,02 ^a	6,61±0,05 ^a
3	6,68±0,05 ^a	6,68±0,04 ^a	6,79±0,06 ^a	6,62±0,06 ^a	6,68±0,07 ^a	6,63±0,08 ^a	6,58±0,04 ^b	6,57±0,06 ^b
6	6,59±0,08 ^a	6,74±0,04 ^a	6,81±0,03 ^a	6,65±0,02 ^a	6,62±0,02 ^{ab}	6,61±0,02 ^{ab}	6,55±0,05 ^b	6,53±0,05 ^b
24	6,62±0,05 ^a	6,72±0,05 ^a	6,74±0,03 ^a	6,58±0,03 ^a	6,59±0,04 ^{ab}	6,55±0,05 ^b	6,49±0,08 ^{bc}	6,51±0,06 ^{bc}
48	6,79±0,06 ^b	6,76±0,03 ^a	6,72±0,04 ^a	6,56±0,05 ^a	6,55±0,05 ^b	6,54±0,02 ^b	6,42±0,05 ^c	6,42±0,08 ^c
72	6,81±0,07 ^b	6,77±0,08 ^a	6,62±0,05 ^{ab}	6,53±0,04 ^{ab}	6,46±0,05 ^{bc}	6,51±0,02 ^{bc}	6,33±0,06 ^{cd}	6,35±0,12 ^{cd}
96	6,74±0,05 ^b	6,69±0,05 ^a	6,56±0,04 ^b	6,51±0,05 ^{ab}	6,40±0,02 ^{bc}	6,48±0,05 ^c	6,28±0,02 ^{cd}	6,31±0,08 ^d
120	6,63±0,06 ^{ab}	6,62±0,04 ^{ab}	6,42±0,07 ^b	6,45±0,07 ^b	6,36±0,04 ^c	6,44±0,02 ^c	6,21±0,07 ^d	6,24±0,07 ^e
144	6,62±0,03 ^a	6,58±0,05 ^b	6,41±0,02 ^{bc}	6,43±0,02 ^b	6,31±0,02 ^c	6,41±0,03 ^c	6,14±0,08 ^e	6,18±0,05 ^e
168	6,58±0,04 ^a	6,56±0,03 ^b	6,38±0,08 ^c	6,41±0,05 ^b	6,27±0,06 ^c	6,33±0,02 ^d	6,08±0,05 ^f	6,12±0,03 ^f

Valores são médias das triplicatas por grupo $\pm$ EP. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de exposição ao mesmo tratamento; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Segundo Concollato et al. (2014) qualquer tipo de interferência estressante ante morte provoca rápida depleção do nível de glicogênio (como o caso do jejum extenso), levando a uma elevação da concentração de ácido láctico nos músculos do peixe, afetando desta maneira o pH no período pré-abate. Esta observação é reforçada neste estudo, pelas observações feitas referentes à avaliação da concentração de glicose plasmática

apresentada anteriormente, onde o jejum de 72h/hipotermia apresentou menores valores. Analisando os métodos de insensibilização não houve diferença entre ambos, porém os tratamentos de jejum com hipotermia apresentaram médias inferiores comparadas com as de eletronarcose. Possivelmente o estresse severo do jejum mais a demora na insensibilização por choque térmico esgotaram mais rapidamente as reservas energéticas do músculo, produzindo mais ácido láctico e reduzindo o pH muscular (WANG et al., 2009).

A medida dielétrica não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os oito tratamentos e observou-se um comportamento semelhante ao longo do tempo de estocagem, explicado por uma equação linear, onde valores mensurados nas primeiras horas apresentaram-se mais elevados, indicando que o grau de frescor dos peixes estava alto. Os resultados aqui encontrados mostram que tal medida tem tendência de queda dos valores conforme o tempo transcorrido, porém nenhum dos tratamentos aplicados foi capaz de interferir significativamente na vida útil das amostras sob refrigeração.

Figura 3 – Valores médios da medida dielétricas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tipos de jejum e insensibilizadas por hipotermia (esquerda) e eletronarcose (direita) refrigeradas por 7 dias.

O intervalo de valores do “Freshness Meter” incide no conjunto de propriedades dielétricas do peixe e pode ser utilizado para indicar o processo de deterioração e período de vida útil restante em todo o peixe fresco (ÓLAFSDÓTTIR et al., 1997). Ochrem et al. (2014) também avaliando o frescor através da medida dielétrica, em carpa capim (*Cyprinus carpio*) eviscerada e não eviscerada e mantida resfriada por 10 dias, constataram que não foram verificadas diferenças significativas com esta forma de armazenamento.

Constatou-se que em relação aos teores de ATP muscular houve diferença significativa ($p < 0,05$) já no momento do abate (0h) entre o tratamento jejum 48h insensibilizadas por hipotermia ($10,82 \mu\text{mol/g}$) e eletronarcose ($11,13 \mu\text{mol/g}$) e ao tratamento jejum 72h insensibilizadas por hipotermia ($8,98 \mu\text{mol/g}$) e eletronarcose ($9,33 \mu\text{mol/g}$). O grupo de jejum 72h à medida que avançavam as horas de estocagem, apresentou níveis reduzidos de ATP diferenciando-se dos demais tratamentos, sendo os menores valores encontrados no grupo jejum 72 horas insensibilizados pela hipotermia ($3,28 \mu\text{mol/g}$) às 168 horas após o abate. No presente estudo a partir do período de 72 horas de estocagem ocorreu um acentuado declive da concentração de ATP, fato que coincide com a permanência e estabilização biológica do estado de *rigor mortis* (Fig. 4 A).

Figura 4 – Degradação do ATP e seus produtos de degradação em filés de tilápias submetidas a diferentes jejuns (J0-sem jejum; J24-jejum 24h; J48-jejum 48h e J72-jejum 72h) e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) mantidas por 7 dias de armazenamento sob refrigeração. Asterisco indica que houve significância em nível de 5% com os demais tratamentos que não possuem asterisco, porém não se diferem entre si.

Zampacavallo et al. (2014) encontraram em robalo (*Dicentrarchus labrax*), para níveis de ATP no momento do abate (0h) valores mais elevados na insensibilização por choque térmico ($8,13\mu\text{mol/g}$) do que para eletronarcose ($3,53\mu\text{mol/g}$), e à medida que avançavam as horas de estocagem esses níveis foram sendo reduzidos até $3,96$ e $0,22\mu\text{mol/g}$ às 5 horas após o abate, respectivamente para choque térmico e eletronarcose. Tais dados não coincidem com os encontrados nesta pesquisa. Além disso, relatos de Shi e colaboradores (2014) sobre o teor de ATP na carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) demonstraram aumento inicial e depois diminuição drástica destes valores, aplicando como fonte de estresse elevada concentração de sal na água. Não foi observado tal comportamento na taxa inicial de ATP neste trabalho com a aplicação do estresse crônico (restrição alimentar) e agudo (insensibilizações), sendo um possível indício de que diferentes fatores estressantes podem causar diferentes respostas na concentração de ATP.

Os níveis de ADP e AMP (Fig. 4 B e C) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p>0,05$), tendo estes índices elevados nas primeiras horas após o abate, apresentando ligeiro decréscimo a partir das 24h de armazenamento. IMP não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos, porém com a degradação do ATP o IMP acumulou-se em todas as amostras de peixe e seus níveis foram mais elevados às 48h, destacando os tratamentos de jejum 72 horas hipotermia ($5,08$) e eletronarcose ($5,11\mu\text{mol/g}$). As concentrações de inosina não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos.

Houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os tempos de estocagem para hipoxantina (Hx), onde o tratamento de jejum 72 horas/hipotermia apresentou índices mais elevados (inicialmente $0,26\pm 0,12\mu\text{mol/g}$) e se manteve em constante aumento até o final do experimento (taxa final $1,16\pm 0,05\mu\text{mol/g}$). Vale ressaltar que o aparecimento da substância hipoxantina indica o possível marco da deterioração por meio de ação microbiológica e início das alterações autolíticas sofridas no músculo (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011). Com isso observou-se que os peixes do tratamento de jejum 72 horas/hipotermia apresentaram menor grau de frescor comparado aos demais tratamentos.

O esgotamento progressivo das reservas de ATP está correlacionado ao aparecimento e instalação gradual do *rigor mortis* e com a saída deste estado (ZAMPACAVALLLO et al., 2003). Portanto, através do IRM nas primeiras horas após o

abate e nas últimas horas de análises podem ser obtidas algumas informações sobre o estado de estresse sofrido pelos peixes antes do abate. No presente estudo, dentre os oito tratamentos, aparentemente jejum 72 horas/hipotermia foi o de pior resultado.

O valor K determina o frescor em pescados, através da razão entre a Hx e o nível total de ATP e seus produtos da degradação (OGAWA; MAIA, 1999). Alguns limites do valor K para a carne de peixes são tabelados, onde: <5% peixes recém-mortos (sem sofrimento), <20% pode ser ingerido cru como sushi e sashimi, 20 a 60% precisa ser aquecido para o consumo, 60 a 80 % mostra sinais de putrefação. Para este estudo o índice K apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para o tratamento jejum 72h/hipotermia e eletronarcose, sendo os índices mais elevados dentre os tratamentos; e houve diferença ao longo do tempo de estocagem atingindo valores mais elevados de K ao final do período de 7 dias de análises (acima de 30%). Um dos tratamentos apresentou índices iguais ou maiores que 60%, indicando que os filés analisados neste trabalho estavam aptos para o consumo desde que se fizesse o cozimento prévio.

Figura 5 – Índice K em filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração. Asterisco indica que houve significância em nível de 5% com os demais tratamentos que não possuem asterisco, porém não se diferem entre si.

Em wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) recém capturados encontraram para o valor K no momento do abate nível de 5% (SONG et al., 2011). Dados similares foram encontrados neste trabalho. Li et al. (2017) pesquisando a comparação de mudanças *postmortem* em carpa (*Cyprinus carpio*) também encontraram valores iniciais com 5%.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o jejum mais prolongado (72 horas) aplicado durante o teste, associado a uma insensibilização demorada (hipotermia) tem efeito deletério sobre o metabolismo da tilápia e pode provocar rápida deterioração do produto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERETE, L.; REIG, L.; ALVAREZ, D.; FLOS, R.; TORT, L. Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture**, 287(1-2), 139-144. 2009.
- ALMEIDA, N. M. D.; BATISTA, G. M.; KODAIRA, M.; VAL, A. L.; LESSI, E. Determination of the rigor-mortis index and its relation with rate decrease nucleotides of a cultivated amazonian fish. **Ciência Rural**, 35(3), 698-704. 2005.
- BARCELLOS, L. J. G.; MARQUEZE, A.; TRAPP, M.; QUEVEDO, R. M.; FERREIRA, D. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 300 (1-4), 231-236. 2010.
- BITO, M.; YAMADA, K.; MIKUMO, Y.; AMANO, K. Difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified cutting's method. **Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory**, 109, 89-93. 1983.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA)**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA - Pescados e derivados, Capítulo VII. Brasília. 2001.
- BURNS, G. B.; KEE, P. J.; IRVINE, B. B. Objective procedure for fish freshness evaluation based on nucleotide changes using a HPLC system. **Canadian Technical Reports of Fisheries and Aquatic Science**, 1373, 35. 1985.
- CASTRO, F. J.; FERNANDES, M. N. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá**, 361-388. 2009.
- CONCOLLATO, A.; PARISI, G.; OLSEN, R. E.; KVAMME, B. O.; SLINDE, E.; ZOTTE, A. D. Effect of carbon monoxide for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) slaughtering on stress response and fillet shelf life. **Aquaculture**, 433, 13–18. 2014.

CONTE, L.; SONODA, D. Y.; SHIROTA, R.; CYRINO, J. E. P. Productivity and economics of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* cage culture in South-East Brazil. **Journal of applied aquaculture** 20(1):18-37. 2008.

COSTA-BRAGA, D.; ROSSI, J. L.; SRBEK-ARAÚJO, A. C. Exotic species as the main prey items of the Neotropical otter in the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Tropical Ecology** 60(1):30-40. 2019.

DOMENICI, P.; STEFFENSEN, J. F.; MARRAS, S. The effect of hypoxia on fish schooling. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 372, 20160236. 2017.

GATICA, M. C.; MONTI, G. E.; KNOWLES, T.G.; GALLO, C. B. Effects of crowding on blood constituents and flesh quality variables in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, 42(3), 187-193. 2010.

HAYASHI, M.; NAKATA, K. Effect of contaminating bacteria on the inosinic acid content of chicken meat. **Journal of Home Economics of Japan**, 54 (6):441–448. 2003.

HERNANDEZ, M. D.; LÓPEZ, M. B.; ALVAREZ, A.; FERRANDINI, E.; GARCIA GARCIA, B.; GARRIDO, M. D. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. **Food Chemistry**, 114(1), 237-245. 2009.

HONG, H.; REGENSTEIN, J. M.; LUO, Y. The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, 57(9), 1787-1798. 2017.

HULTMANN, L.; PHU, T. M.; TOBIASSEN, T.; AAS-HANSEN, Ø.; RUSTAD, T. Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Food chemistry**, 134(3):1399-1408. 2012.

JONES, H. A. C.; NOBLE, C.; DAMSGÅRD, B.; PEARCE, G. P. Investigating the influence of predictable and unpredictable feed delivery schedules upon the behaviour and welfare of Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) using social network analysis and fin damage. **Applied animal behaviour science**, 138(1-2), 132-140. 2012.

KESTIN, S. C.; VAN DE VIS, J. W.; ROBB, D. H. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. **Veterinary Record**, 150(10), 302-307. 2002.

KOBERSTEIN, T. C. R. D.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Comportamento alimentar de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) por meio das observações do tempo de retorno do apetite e do tempo de saciação dos peixes em duas temperaturas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 26(3), 339-344. 2004.

KOSEKI, S.; KITAKAMI, S.; KATO, N.; ARAI, K. Rigor mortis of fish and shellfish and evaluation of freshness of their muscles as K value. **Journal of School of Marine Science and Technology-Tokai University (Japan)**, 4:31–46. 2006.

KOYAMA, N.; MATSUKAWA, M.; SHIMADA, M.; SATO, R. The change of ATP and its related compounds of the *Penaeus vannamei* muscle and effect of the sense of taste. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 74:1068–1074. 2008.

LI, Q.; ZHANG, L.; LU, H.; SONG, S.; LUO, Y. Comparison of postmortem changes in ATP-related compounds, protein degradation and endogenous enzyme activity of white muscle and dark muscle from common carp (*Cyprinus carpio*) stored at 4°C. **LWT-Food Science and Technology**, 78, 317-324. 2017.

MATSUMOTO, M.; YAMANAKA, H. Changes in contents of glycolytic metabolites and free amino acids in the muscle of kuruma prawn during storage. **Nippon Suisan Gakk**, 56:1515–1520. 1990.

MOLENTO, C. F. M. Bem-estar e produção animal: aspectos econômicos – revisão. **Archives of Veterinary Science**, 10(1), 1-11. 2005.

NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J. Fasting andstarvation. In: Hochachka, P.W., Mommsen,T.P. (Eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, vol. 4. Elsevier, New York,pp. 393–434. 1995.

NGUYEN, P. L.; HAMAN, K.; CARSTENSEN, L.; McKLVEEN, T.; COONEY, P.; GIBSON, S. Evaluation of Three Electrical Outputs in an Electro-Immobilization System to Reduce Induction Time during Routine Handling of Fish at a Hatchery. **North American Journal of Aquaculture**, 80(3): 239-248. 2018.

NIE, L. J.; CAO, Z. D.; FU, S. J. Digesting or swimming? Integration of the postprandial metabolism, behavior and locomotion in a frequently foraging fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 204, 205-210. 2017.

OCAÑO-HIGUERA, V.; MAEDA-MARTINEZ, A.; MARQUEZ-RIOS, E.; CANIZALES-RODRIGUEZ, D.; CASTILLO-YAÑEZ, F.; RUIZ-BUSTOS, E.; GRACIANO-VERDUGO, A.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. **Food Chemistry**, 125(1), 49–54. 2011.

OCHREM, A. S.; ZAPLETAL, P.; MAJ, D.; GIL, Z.; ZYCHLINSKA-BUCZEK, J. Changes in physical and dielectrical properties of carp meat (*Cyprinus carpio*) during cold storage. *Journal of Food Process Engineering*, 37(2), 177–184. 2014.

OLAFSDOTTIR, G.; NESVADBA, P.; DI NATALE, C.; CARECHE, M.; OEHLenschläger, J.; TRYGGVADOTTIR, S. V.; SCHUBRING, R.; KROEGER, M.; HEIA, K.; ESAIASSEN, M.; MACAGNANO, A.; JØRGENSEN, B. M. Multisensor

for fish quality determination. **Trends in Food Science & Technology**, 15(2), 86-93. 2004.

OLIVEIRA FILHO, P. R. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; SOBRAL, P. J. A.; BALIEIRO, J. C. C.; NATORI, M. M.; VIEGAS, E. M. M. How stunning methods affect the quality of Nile tilapia meat. **CyTA – Journal of Food**, 13(1), 56–62. 2014.

ÖZOGUL, Y.; ÖZOGUL, F. Effects of slaughtering methods on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored in ice and MAP. **European Food Research and Technology**, 219 (3), 211–216. 2004.

RIBAS, L., FLOS, R., REIG, L., MACKENZIE, S., BARTON, B.A., TORT, L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality. **Aquaculture**, 269 (1-4), 250–258. 2007.

ROBB, D. H. F.; KESTIN, S. C. Methods used to kill fish: Field observations and literature reviewed. **Animal Welfare**, 11 (3), 269–282. 2002.

ROBB, D.H.F., KESTIN, S.C., WARRISS, P.D. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. **Aquaculture**, 182 (3-4), 261-269. 2000.

ROTH, B.; IMSLAND, A.; GUNNARSSON, S.; FOSS, A., SHELVIS-SMITH, R. Slaughter quality and rigor contraction in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*); a comparison between different stunning methods. **Aquaculture**, 272(1-4): 754-761. 2007.

SAITO, T. A new method for estimating the freshness of fish. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 24, 749-750. 1959.

SEKI, H.; HAMADA-SATO, N. Identification of bacteria that contribute to IMP degradation in horse mackerel. **Journal of Food Processing and Technology**, 5:363. 2014.

SEKI, H.; NAKAZATO, K.; HAMADA-SATO, N. Adenosine monophosphate degradation and inosinic acid accumulation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **International Aquatic Research**, 9(1), 37-52. 2017.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, 1(4667):1383-1392. 1950.

SELYE, H. The evolution of the stress concept. **American Scientist**, 61:692-699. 1973.

SETH, H.; AXELSSON, M.; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; KIESSLING, A.; SANDBLOM, E. Physiological responses and welfare implications of rapid hypothermia and immobilization with high levels of CO² at two temperatures in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). **Aquaculture**, 402, 146-151. 2013.

- SHI, C.; CUI, J.; LUO, Y.; ZHOU, Z. Effect of lightly salt and sucrose on rigor mortis changes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) stored at 4°C. **International Journal of Food Science and Technology**, 49 (1), 160–167. 2014.
- SONG, Y.; LIU, L.; SHEN, H.; YOU, J.; LUO, Y. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). **Food Control**, 22(3-4), 608-615. 2011.
- TINARWO, A. The ethical slaughter of farmed fish, in Kaiser, M. and Lien, M. (Eds), **Ethics and the politics of food**, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp.457-463. 2006.
- TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of clinical Biochemistry**, 6(1), 24-27. 1969.
- WANG, J.; LU, D. Q.; JIANG, B.; LUO, H. L.; LU, G. L.; LI, A. X. The effect of intermittent hypoxia under different temperature on the immunomodulation in Streptococcus agalactiae vaccinated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & shellfish immunology**, 79, 181-192. 2018.
- WANG, Y.; LI, C.; QIN, J. G.; HAN, H. Cyclical feed deprivation and refeeding fails to enhance compensatory growth in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture research**, 40(2), 204-210. 2009.
- WONG, M. Y.; MUNDAY, P. L.; BUSTON, P. M.; JONES, G. P. Fasting or feasting in a fish social hierarchy. **Current Biology**, 18(9), R372-R373. 2008.
- YASMIN, L.; KAMAL, M.; AHMED, S. A. K.; AZIMUDDIN, K. M.; KHAN, M. N. A.; ISLAM, M. N. Studies on the Post-mortem Changes in Genetically Improved Farmed Tilapia (*Oreochromis niloticus*) During Ice Storage. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 4(9):1144-1146. 2001.
- ZAMPACAVALLLO, G.; PARISI, G.; MECATTI, M.; LUPI, P.; GIORGI, G.; POLI, B. M. Evaluation of different methods of stunning/killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by tissue stress/quality indicators. **Journal of food science and technology**, 52(5):2585-2597. 2015.
- ZAMPACAVALLLO, G.; SCAPPINI, F.; MECATTI, M.; IURZAN, F.; MOSCONI, G.; POLI, B. M. Study on methods to decrease the stress at slaughter in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Italian Journal of Animal Science**, 2(sup1), 616-618. 2003.

CAPÍTULO 2.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) SUBMETIDAS A DIFERENTES MANEJOS NO PRÉ- ABATE

RESUMO

A aquicultura no Brasil encontra-se em uma fase de expansão, porém ainda não existem diretrizes que normatizem a etapa do pré-abate, principalmente na aplicação do jejum e insensibilização e sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a espécie de peixe mais produzida no país, a mesma deve ser amplamente estudada. O presente estudo teve por objetivo analisar diferentes períodos de jejum combinados a métodos de insensibilização pré-abate, sobre as alterações hematológicas e bioquímicas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). As tilápias foram submetidas à exposição a diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 horas) e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcole. Após a insensibilização as tilápias foram abatidas e então submetidas a análises hematológicas (glicose, lactato e amônia; contagem de eritrócitos e leucócitos totais; contagem diferencial de leucócitos); cor dos fígados (luminosidade - L*, intensidade da cor vermelho-verde - a* e intensidade da cor amarela-azul - b*); índice hepatossomático (IHS); índice viscerossomático (IVS); determinação da atividade das enzimas glutatona redutase (GR), catalase (CAT) e lactato desidrogenase (LDH); e determinação de produtos finais da lipoperoxidação (TBARS) oriundas da musculatura da tilápia. O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado para as análises do sangue, cor do fígado, IHS e IVS; para as demais análises foi utilizado o delineamento estatístico um esquema fatorial sendo 3 (períodos de jejuns) x 2 (insensibilizações) e três pontos amostrais (0, 24, 48h) referentes as amostras mantidas sob refrigeração. Todos os dados foram submetidos a ANOVA e quando constatada diferença significativa ($p < 0,05$) as médias foram então comparadas pelo teste de Tukey. Não houve diferença para eritrócitos e leucócitos ($p > 0,05$), mas para trombócitos houve maior taxa no tratamento jejum 48h/hipotermia ($p < 0,05$), indicando que o jejum mais prolongado associado ao choque térmico mobilizam maior ação do sistema de defesa do organismo. Além disso, houve alta concentração de LDH nos tratamentos de jejum 48h/hipotermia e eletronarcole, mostrando que o estresse desse manejo pré-abate mobiliza a ativação e ação das enzimas antioxidantes podendo interferir no processo da lipoperoxidação muscular, carreando assim na rápida deterioração do produto a ser comercializado. Conclui-se perante os dados estudados que tilápias submetidas a períodos menores de 48h de jejum seguidos de insensibilizações menos demoradas e invasivas, não incidem negativamente em aspectos de bem-estar animal e qualidade de pescado.

Palavras-chave: Bem-estar em tilápias; Biomarcadores de estresse oxidativo; Jejum e insensibilização em tilápia; Reação hepática ao estresse.

ABSTRACT

Aquaculture in Brazil is in an expansion phase, but there are no directives that regulate the pre-slaughter stage, mainly in the application of fasting and stunning, and Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*) being the most produced fish species in the country, it should be widely studied. The present study aimed to analyze different periods of fasting combined with pre-slaughter insensitization methods on hematological and biochemical alterations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The tilapias were exposed to different fasting periods (0, 24, 48 hours) and later numb by hypothermia and electronarcosis. After stunning the tilapia were slaughtered and then submitted to hematological analyzes (glucose, lactate and ammonia; erythrocyte and total leukocyte count; differential leukocyte count); liver color (luminosity - L *, intensity of red-green color - a * and intensity of yellow-blue color - b *); hepatosomatic mean indices (IHS); viscerosomatic indices (IVS); determination of glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and lactate dehydrogenase (LDH) activity; and determination of lipoperoxidation end products (TBARS) from tilapia muscles. The experiment was carried out in a completely randomized design for the analysis of blood, liver color, IHS and IVS; For the other analyzes, a statistical design was used, a factorial scheme being 3 (fasting periods) x 2 (numbness) and three sampling points (0, 24, 48h) referring to the samples kept under refrigeration. All data were submitted to ANOVA and when significant difference ($p < 0.05$) was found the means were then compared by Tukey test. There was no difference for erythrocytes and leukocytes, but for thrombocytes there was a higher rate of fasting treatment 48h/hypothermia, indicating that the longer fasting associated with thermal shock mobilize greater action of the body's defense system. In addition, there was a high concentration of LDH in the 48h fasting/hypothermia and electronarcosis treatments, showing that the stress of this pre-slaughter management mobilizes the activation and action of antioxidant enzymes and may interfere with the fish muscle lipoperoxidation process, thus leading to rapid deterioration of the product to be marketed. It can be concluded from the studied data that tilapia submitted to fasting periods shorter than 48h followed by less time consuming and invasive insensitivities do not negatively affect animal welfare aspects and fish quality.

Keywords: Welfare tilapia; Biomarkers of oxidative stress; Fasting and stunning in tilapia; Hepatic reaction to stress.

1. INTRODUÇÃO

As práticas de manejo da piscicultura, mesmo quando bem conduzidas, podem gerar estresse, expondo os animais aquáticos a estímulos adversos ao seu equilíbrio metabólico com o ambiente (homeostase). O estresse sofrido por práticas de manejo mal elaboradas pode causar alta taxa de mortalidade, queda no crescimento e afetar a reprodução dos animais. Os peixes que são direcionados ao abate, também sofrem com o estresse dessas práticas, prejudicando sua qualidade (CONTE, 2004; GATICA et al., 2010; DIGRE et al., 2011). O estresse pré-abate pode reduzir o tempo de *rigor mortis* dos peixes fazendo com que o animal desenvolva um rigor mais drástico, afetando a textura da sua carne e outras características de qualidade. Os peixes que são submetidos a

diferentes níveis de estresse apresentam qualidade de carne inferior e maior susceptibilidade aos processos de deterioração durante o armazenamento, comparada à carne de peixes não estressados antes do abate (ASHLEY, 2007; DIGRE et al., 2010).

Dentre as várias práticas de manejo estressantes está a aplicação do jejum e a insensibilização. A aplicabilidade do jejum incide diretamente em aspectos nutricionais e na manutenção da homeostase corpórea; e a insensibilização pré-abate está ligada a fatores correlacionados à dor e até mesmo a morte do peixe. Ambas as atividades na piscicultura desencadeiam respostas ao estresse (aguda e crônica), influenciando a qualidade da matéria prima para a indústria processadora (OLIVEIRA; GALHARDO, 2007). Existe uma ampla variedade de metodologias correlacionando estas duas atividades no pré-abate, porém cada uma destas combinações induz a diversos níveis de estresse (LINES et al., 2003). Portanto, compreender e estabelecer protocolos menos invasivos se torna essenciais dentro da piscicultura.

As pesquisas que são realizadas para estabelecer critérios de controle e possíveis melhorias ao manejo usam técnicas laboratoriais relacionadas a determinação de elementos do sistema hematopoiético, sendo o sangue a matéria de estudo de maior relevância, porque este possui componentes que refletem os processos vitais - principalmente correlacionados a defesa imunológica – que incidem no organismo de peixes. Em trabalhos que envolvem a presença ou ausência de alimentos e que são determinantes no desempenho zootécnico e nas características da carcaça dos peixes, as análises hematológicas são essenciais, pois o sangue é um dos tecidos mais dinâmicos do organismo e altera-se em função do tipo de dieta consumida ou não consumida (RANZINI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004; ARAUJO et al., 2011).

Além disso, estudar o comportamento de órgãos alvo, como o fígado, são essenciais para compreender como o estresse do manejo pode afetar determinados mecanismos bioquímicos do peixe. O fígado se destaca porque é um órgão biotransformador de enzimas, capazes de incidir na estimulação da produção do muco e por alterar a capacidade absorviva de conteúdo pelo intestino (ASHLEY, 2007; DIGRE et al., 2010). As vísceras de um modo geral são biomarcadores que vem sendo utilizados em estudos de campo para avaliar o efeito estressante do manejo, pois a diferenciação das lesões aparentes nos órgãos pode ser utilizada para monitorar e controlar determinadas práticas na fase pré-abate (ASHLEY, 2007; SCHWAIGER, 2001).

Não existem informações conclusivas sobre o melhor método de jejum e insensibilização para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que seja, ao mesmo tempo, menos estressante e que proporcione melhor qualidade de carne. Com isso, o presente estudo teve por objetivo avaliar diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 horas) combinados a métodos de insensibilização pré-abate (hipotermia e eletronarcose), sobre as alterações de aspectos hematológicos e da bioquímica da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), sob o protocolo CEUA no. 7758310817.

2.1 Animais e procedimento experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), em Pirassununga - SP. As 36 tilápias do Nilo (peso médio de $542,63 \pm 45,04$ g e comprimento médio de $31,02 \pm 1,84$ cm) foram adquiridas em uma piscicultura comercial e aclimatadas em três tanques de concreto ($n = 12$) por dez dias antes do início dos experimentos para evitar que o estresse causado pelo transporte pudesse interferir nos resultados.

Após a aclimação, cada lote de peixes foi submetido a um dos diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 horas) e posteriormente seis animais de cada lote foram insensibilizados por dois métodos: (1) hipotermia - exposição dos animais a solução de água e gelo na proporção 1:1, (2) eletronarcose - exposição dos animais à corrente elétrica de 220 volts, 1500 Hz, 3,5 amperes por 15s. A insensibilização foi confirmada pela ausência de reflexos ao estímulo da linha lateral, observação da natação, do equilíbrio, ausência de comportamento de fuga, movimentação do opérculo e pela ausência reflexo vestibulo-ocular, segundo o protocolo proposto por Kestin, Van des Vis e Robb (2002).

Foi realizada a aferição dos parâmetros da qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade) com o auxílio da sonda multi-

parâmetro Horiba (modelo U-10), antes e após a insensibilização das tilápias expostas aos tratamentos. Posteriormente a isso, as tilápias foram abatidas através do corte das brânquias e feito a sangria em água gelada e filetadas, sendo este material submetido a análises laboratoriais. A Figura 6 mostra com maiores detalhes a montagem do teste.

Figura 6- Na figura A há detalhes do condicionamento, na B da espécie estudada. Na figura C encontra-se o maquinário utilizado para o choque elétrico e na figura D observa-se coleta de material biológico (sangue).

2.2 Procedimentos pós-abate e análises laboratoriais

Para determinar a concentração de glicose usou-se o “kit” Accu Chek Advantage 2 Roche®. Para lactato e amônia foram utilizadas as frações de plasma obtidas por centrifugação das amostras de sangue, coletado após o abate do peixe por via caudal com o uso de seringas individuais contendo anticoagulante (heparina). As análises desses parâmetros foram feitas através de reagentes comerciais padronizados, utilizados pelo Hospital Veterinário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos do Campus Dr. Fernando Costa, Pirassununga-SP.

A contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos foi realizada manualmente na Câmara de Neubauer, conforme técnica de Hrubec et al. (2000) modificada, substituindo a solução de Natt-Herrick pelo azul de toluidina a 0,2% como corante diluidor. Os esfregaços sanguíneos foram feitos, em duplicata, as quais foram coradas, pelo método de Rosenfeld (1947), para contagem diferencial de leucócitos.

Após a coleta de sangue, todos os peixes foram eviscerados e filetados. A cor foi avaliada nos fígados com um colorímetro HunterLab (Miniscan XE), operando com iluminante D65, ângulo de 10° e célula de medida com abertura de 30 mm. Foram usados os parâmetros de cor, luminosidade (L^*) varia de 0 a 100 (preto a branco); parâmetro a^* varia do verde (-) ao vermelho (+); parâmetro b^* varia do azul (-) ao amarelo (+) (CIE, 1978). Para a determinação do índice hepatossomático foi utilizada a fórmula $IHS (\%) = (Wh/Wt) \times 100$ (em que Wh = peso médio do fígado em g, e Wt = peso médio total do peixe em g) e para o índice viscerossomático $IVS (\%) = (Wgv/Wt) \times 100$ (em que Wgv = peso das vísceras em g, e Wt = peso médio, total do peixe, em g) (ESTRADA-GODÍNEZ et al., 2014).

Em três filés foram retirados 2g da musculatura (lado esquerdo) periodicamente nos tempos pré-determinados às 0, 3, 6, 24 e 48 horas pós-abate e armazenados em nitrogênio líquido para posterior avaliação da atividade basal das enzimas glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e lactato desidrogenase (LDH). Para os ensaios enzimáticos, as amostras dos tecidos musculares foram homogeneizadas em solução resfriada de tampão fosfato 10mM, pH 7,5, utilizando-se um homogeneizador universal (1g de tecido 10mL⁻¹ do tampão), de acordo com Lins et al. (2006). A atividade de GR foi avaliada espectrofotometricamente através da oxidação do NADPH com concomitante redução da glutathione oxidada a 340nm e 25°C por três minutos, sendo que o meio de ensaio continha tampão fosfato de potássio 100mM pH7,0, EDTA 1mM; NADPH 0,1mM e GSSG 1 mM (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). A atividade da CAT foi medida a 240nm, seguindo-se a redução da H₂O₂ (BEERS; SIZER, 1952). A atividade da LDH foi analisada seguindo-se as mudanças de absorbância a 340nm (BERNT; BERGMAYER, 1974). Todos os reagentes utilizados eram da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Para avaliação da lipoperoxidação usou-se a determinação de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) de acordo com a metodologia proposta por Vyncke (1970) com algumas adaptações: as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram quantificadas em amostras de três filés esquerdos de cada tratamento, analisados nos tempos pré-determinados citados anteriormente. Foram retirados 5g de amostra, triturada em processador de alimentos e misturados em 25 mL TCA (7,5%). A solução foi filtrada em papel filtro (Whatman n°1) e foram retirados 4 mL do filtrado e misturados a 1mL de TCA (7,5%) e a 5mL de TBA (0,02M) e essa solução foi fervida em banho

maria a 95°C durante 60 minutos. Posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro (600 Femto) com comprimento de onda de 538nm. Os resultados foram expressos em mg de malonaldeído/kg amostra.

2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos para as análises hematológicas e cor de fígados, IHS e IVS, foram submetidos a cálculos de média e desvio padrão, e posteriormente feita a análise de variância ANOVA, complementada por Tukey, em um nível de confiança de 95%. Para as demais análises foi utilizado um esquema fatorial sendo 3 (períodos de jejuns) x 2 (insensibilizações) e cinco pontos amostrais (0, 3, 6, 24, 48 horas), sendo os dados submetidos à análise de variância ANOVA, e para as médias diferentes foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância a 5%. Foram realizadas regressões para os fatores quantitativos com interação significativa. Utilizou-se o Programa MINITAB® versão 14.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade de água dos tanques manteve-se estável durante a aclimação (pH: 6,56, [O₂]: 8,7 mg.L⁻¹, temperatura 25,3°C) e durante o experimento os valores de pH e oxigênio dissolvido (OD) mantiveram-se estáveis durante toda a aplicação da corrente elétrica e dentro do esperado para a água utilizada nos tratamentos. A salinidade observada no tratamento de eletronarcose (0,02%) ocorreu devido a diluição de NaCl na água onde os peixes foram imersos para a aplicação da corrente com o intuito de melhorar a condutividade elétrica, aumentando assim a eficácia do tratamento. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4. Durante o experimento observou-se que houve uma maior demora na insensibilização aparente nos jejuns 48h (hipotermia) (17 minutos).

Tabela 4 – Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade da água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) das caixas onde foram aplicadas as insensibilizações com hipotermia e eletronarcose das tilápias submetidas a jejuns diferentes.

Jejum	Insensibilização	Tempo de insensibilização	OD (mg/L)	Temperatura (°C)	Condutividade (µ/cm)	pH	Salinidade (%)
			Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização
Jejum 0h	Hipotermia	15 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,219/0,206	6,15/6,08	0/0
	Eletronarcose	15s	8,23/8,24	24,1/24,5	0,589/0,578	7,04/7,00	0,02/0,02
Jejum 24h	Hipotermia	15 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,222/0,198	6,56/6,44	0/0
	Eletronarcose	15s	8,39/8,39	24,3/24,5	0,632/0,630	6,82/6,82	0,02/0,02
Jejum 48h	Hipotermia	17 min	19,99/19,99	1,2/1,4	0,215/0,227	6,47/6,44	0/0
	Eletronarcose	15s	8,24/8,25	24,1/24,7	0,572/0,569	7,03/7,03	0,02/0,02

Peixes submetidos ao jejum 48h/eletronarcose apresentaram os menores ($p < 0,05$), teores de glicose plasmática ($36,40 \pm 3,47 \text{ mg/dL}$). Possivelmente isso ocorreu porque além do jejum prolongado, (que já é um fator estressor crônico), associado a um rápido episódio de estresse - como a eletronarcose (considerado estresse agudo), fazem com que essas ações sejam suficientes para alterar funções biológicas primordiais em peixes, mobilizando desta forma os estoques de glicogênio (MOBERG, 2000) e causando maior debilidade fisiológica à tilápia. Observou-se também que apesar dos tratamentos jejum 24h/hipotermia ($62,23 \pm 5,21 \text{ mg/dL}$) e jejum 24h/eletronarcose ($60,06 \pm 4,12 \text{ mg/dL}$) não terem diferido estatisticamente do jejum 0h/hipotermia ($58,6 \pm 4,03 \text{ mg/dL}$) e jejum 0h/eletronarcose ($56,28 \pm 5,12 \text{ mg/dL}$), os de jejum 24h apresentaram teores médios de glicose, mais elevados. (Figura 7). Dados similares também foram encontrados para outras espécies submetidas a outro tipo de estresse, o transporte - principal justificativa para ser aplicado o jejum. Pirarucu (GOMES et al., 2006), tambaqui (GOMES et al., 2003); matrinxã (URBINATI, CARNEIRO; 2006; ABREU et al., 2008) e pintado (FAGUNDES, 2009), tiveram elevação da glicose sanguínea imediatamente após o transporte com retorno aos níveis basais 24 horas depois.

Figura 7 – Concentrações de glicose (A), lactato (B) e amônia (C) sanguíneo de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados.

Segundo Silveira, Logato e Ponte (2009), o lactato é um bom indicador de estresse. Os valores de lactato (Fig. 7 B) se elevaram nos peixes dos tratamentos com jejum 24h e jejum 48h/hipotermia e eletronarcose, tendo a maior concentração em jejum 24h/hipotermia ($56,52 \pm 7,47 \text{ mg/dL}$). Esse aumento da concentração de lactato determinado logo após o jejum, a despesca e a insensibilização, pode estar relacionado com a movimentação excessiva que os peixes foram expostos, levando à elevação do metabolismo anaeróbico para atender à demanda energética imposta por essas práticas, evidenciado a ocorrência de reações metabólicas anaeróbicas (IWAMA, AFONSO, MATHILAKATH, 2004; INOUE, HACKBARTH, MORAES, 2010; ROTH et al., 2012). Iversen, Finstad, Nilssen (1998), trabalhando com salmão do Atlântico (*Salmo salar*) também encontraram valores de lactato elevados logo após a manipulação onde permaneceram altos por até 48 horas, o mesmo que ocorreu neste trabalho (Fig.7).

Os valores de amônia plasmática não foram diferentes entre os tempos amostrais estudados, porém as médias do tratamento dos peixes submetidos ao jejum 24h/hipotermia e eletronarcose, $7,12 \pm 1,07$ e $7,21 \pm 1,12 \text{ mg/dL}$, respectivamente, mantiveram-se sendo as mais altas (Fig. 07 C). Possivelmente esse aumento da concentração de amônia plasmática após a aplicação de um período de jejum, considerado neste trabalho um estressor crônico, pode estar relacionado com o aumento do catabolismo proteico ou desbalanceamento da excreção nitrogenada. Além disso,

acredita-se que o aumento das catecolaminas durante este extenso período induz maior concentração de amônia circulante como também de lactato no sangue (MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; URBINATE; CARNEIRO, 2004; INOUE et al., 2011).

Na comparação do perfil hematológico dos peixes (Fig. 8), observou-se que os tratamentos empregados não influenciaram ($p>0,05$) na contagem total de eritrócitos e na contagem total das células leucocitárias, porém para concentração de trombócitos houve diferença estatística ($p<0,05$) onde o tratamento com jejum 48h/hipotermia ($47085,1\pm2658/\mu\text{L}$) teve maior concentração destas células, que estão diretamente relacionadas com o sistema de defesa (presente em exsudatos inflamatórios e atividade fagocitária), como relatado por Matushima e Mariano (1996). Possivelmente devido ao estresse do jejum e ao frio do choque térmico há uma queda da resistência imunológica dos peixes e isto pode contribuir para uma maior produção de trombócitos, hipótese também apontada por Falcon et al. (2008).

Os animais do tratamento com jejum 48h apresentaram a nadadeira caudal parcialmente “comida”, se debateram no processo do choque térmico e apresentaram petéquias ao longo do corpo (visualizados após o abate), o que pode indicar que os animais mantidos nesse longo período de jejum associado a uma insensibilização demorada poderiam estar apresentando primeiramente comportamento de canibalismo dentro do tanque e, em uma segunda etapa, se ferindo no processo de insensibilização (devido a natação mais vigorosa, tentativa de saltar da caixa), estimulando então a produção de células de defesa e cicatriciais nos tecidos lesionados. De acordo com Ranzani-Paiva (1991), estes índices encontrados nos valores hematológicos em peixes são influenciados por: fatores do meio (temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e pH da água) – o que não foi o caso desta pesquisa, e fatores como o estresse, induzidos por variações no ciclo sazonal e fatores endógenos (sexo, estágio de maturação gonadal, doenças, e principalmente estado nutricional) – o que pode ter ocorrido neste estudo.

Figura 8 – Dados das variáveis hematológicas (eritrócitos, leucócitos e trombócitos totais) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados.

Na contagem diferencial de leucócitos foi observada predominância linfocitária (Fig. 9). Resultados análogos foram reportados por Barton e Iwama (1991) ao constatarem a queda do número de células brancas totais e de linfócitos pós-estresse em *Pleuronectes platessa*. Observou-se em jejum 24h/hipotermia (77,24%) e jejum 48h/hipotermia (76,30%) índices elevados destas células. A predominância de linfócitos seguidos de neutrófilos e monócitos na contagem diferencial de leucócitos em tilápias deste estudo, apresentou similaridade ao observado por Ezzat et al. (1974), Lea Master et al. (1990), Tavares-Dias e Moraes (2004) e Azevedo et al. (2006). Dessa forma, os linfócitos em peixes podem estar presentes no processo inflamatório e/ou frente a adversidades ambientais, principalmente a estresse térmico (IWAMA; NAKANISHI, 1996).

Figura 9 – Valores da contagem diferencial de leucócitos (%) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.

Segundo Ellis (1981), em peixes o estresse causa linfocitose. Estes dados também corroboram com as observações de Martins et al. (2004) em tilápia. Pelos resultados apresentados neste trabalho aponta-se que a severidade do estresse, oriunda da ausência de alimento mais a insensibilização por choque térmico em um período prolongado, mobilizam o sistema de defesa do organismo. Possivelmente para prevenir infecções às tilápias podem ter mecanismos alternativos à resposta imunológica especificamente suprimida em condições ambientais normais e a fagocitose pode ser um desses mecanismos compensatórios (AINSWORTH et al., 1991; KURATA et al., 1995).

A coloração do fígado de tilápia, órgão considerado crucial para o metabolismo de nutrientes e considerado ótimo indicador para patologias nutricionais (FUJIMOTO et al., 2008; RAŠKOVIĆ et al., 2011), no sistema CIE para o parâmetro luminosidade (L^*) mostrou ter diferença significativa ($p < 0,05$), onde os tratamentos submetidos ao jejum 48h/hipotermia ($58,7 \pm 3,1$) e eletronarcose ($59,5 \pm 3,3$) tiveram índices mais elevados que os demais, indicando desta maneira escurecimento do órgão. A intensidade do parâmetro

a* (verde ao vermelho) não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre os tratamentos (Fig. 10). Esta análise da avaliação macroscópica do órgão torna-se relevante, pois é mais eficaz e rápida que avaliação histológica do tecido, principalmente em um abatedouro de pescado onde se preza agilidade para descarte ou redirecionamento das carcaças.

Figura 10 – Intensidade da cor L*, a* e b* em fígados de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Os peixes submetidos ao jejum apresentaram no parâmetro b*, aumento significativo na coloração, ou seja, um amarelamento, quando comparados ao grupo que não foi submetido ao jejum (Fig. 10). Acredita-se que a restrição alimentar prolongada leva os peixes a um status nutricional debilitado, já que há mobilização de hormônios relacionados à fome e de reservas de energia nos músculos e fígado, levando a alterações no equilíbrio ácido-base do sangue (GATICA et al., 2010). Além disso, este estudo mostrou que a deficiência prolongada de nutriente causa uma disfunção hepática já aparente, pois houve descoloração e amarelamento observado macroscopicamente no órgão, teoria embasada em pesquisa feita por Rašković et al. (2011), podendo até mesmo levar a morte do animal.

Para os índices, IHS e IVS, não foi observado diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos (Fig. 11). Porém, para ambos os índices, os peixes dos tratamentos insensibilizados com eletronarcose tiveram médias mais elevadas que os de hipotermia. Possivelmente o volume diluído de gelo e a temperatura da água podem afetar

momentaneamente o animal ativando modificações fisiológicas locais, mas não alterando a estrutura geral em um curto prazo.

Figura 11 – Índices somáticos (fígados - IHS e vísceras - IVS) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Não houve efeito do tratamento ($p>0,05$).

Para a atividade da glutathione redutase (GR), catalase (CAT) e lactato desidrogenase (LDH), observou-se efeito do tratamento ($p<0,05$). Os tratamentos jejum 48h/hipotermia e eletronarcose apresentaram baixa concentração destes compostos para GR ($1,47\pm0,09$ e $1,47\pm0,09$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) e CAT ($1,38\pm0,08$ e $1,35\pm0,09$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) inicialmente, e o inverso para LDH ($11,13\pm0,73$ e $11,18\pm0,71$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (Fig. 12). Foi constatado também que todos os compostos enzimáticos estudados diminuíram ao longo do tempo de análise (equações exibidas na Fig.12).

Figura 12 – Atividades das enzimas glutatona redutase (GR), catalase (CAT) e lactato desidrogenase (LDH) de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronnarcose. *Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

Importantes alterações em parâmetros metabólicos podem ser observadas quando os mamíferos são submetidos a condições ambientais diferenciadas, podendo induzir mudanças nas propriedades cinéticas, ou seja, na velocidade de ação das enzimas (WEISER et al., 1987; VAL, ALMEIDA-VAL, 1995). Estas mudanças podem também ser observadas em peixes quando submetidos a condições de estresse causado por alterações na temperatura, diminuição de níveis de oxigênio e poluição. Estados de privação alimentar também podem causar depressão ou supressão metabólica (HOCHACHKA, GUPPY, 1987). Como visto neste trabalho, o jejum associado as insensibilizações induziram redução de atividade das enzimas GR e CAT nas tilápias, provando que na presença de fatores estressantes xenobióticos há um aumento dos radicais superóxidos, teoria embasada também por Toni e colaboradores (2010); Yonar, Sakin (2011). Já o índice elevado de LDH, que é uma enzima terminal da glicólise anaeróbia, nos peixes de jejum 48h/hipotermia e eletronarcose, se deve porque os peixes destes grupos possivelmente já estavam com baixa energética e gastaram suas reservas nos movimentos de natações bruscas enquanto estavam sendo insensibilizados (induzido pelo choque térmico e pelo choque elétrico), hipótese baseada nas pesquisas feitas por Brightman e colaboradores (1997).

Valores de peroxidação lipídica determinada através do teste de TBARS foram considerados como sendo alterações bioquímicas e fisiológicas, associada ao aumento do fluxo de oxirradiciais (RLO), (OSAWA et al., 2005). No presente estudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$), no entanto o comportamento deste parâmetro variou dentro do tempo de observação, conforme a Figura 13, onde houve um aumento nas médias dos tratamentos ao final das 48 horas de análises.

Figura 13 – Valores de média e desvio padrão de TBARS encontrados nos pontos de coleta das amostras de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes tempos de jejuns e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Não houve efeito do tratamento ($p > 0,05$).

Alguns pesquisadores também observaram aumentos no conteúdo de TBARS ao longo do armazenamento, como refere-se Rostamzad et al. (2011) para filés de “persian sturgeon” (*Acipenser persicus*), nos quais no primeiro dia de armazenamento obtiveram 0,2mg/kg de malonaldeído e no sexto mês esse valor chegou a 2,7mg/kg. Seifzadeh, Motallebi e Mazloumi (2012) analisando filés de kilka (*Clupeonella delicatula*) verificaram que o valor de TBARS no primeiro dia de congelamento chegou a 0,03mg/kg e ao sexto mês 0,32mg/kg. Possivelmente para que haja efeito significativo deste composto, o tempo de armazenagem deverá ser maior que 48 horas e a forma de estocagem em temperaturas mais elevadas poderá afetar a concentração do composto.

Vale ressaltar que as amostras desta pesquisa estavam dentro da normalidade de acordo com Al-Kahtani, Abu-Tarboush, Bajaber (1996), que designa para produtos cárneos considerados em bom estado, teores de TBARS abaixo de 3mg de malonaldeído por kg e demonstraram estarem dentro dos padrões de normalidade para consumo direto (cru), já que valores de TBARS acima de 1,59mg de aldeído malônico/kg de amostra podem causar danos à saúde do consumidor (TORRES, OKANI; 1997) e os resultados encontrados neste trabalho foram menores que este índice.

4. CONCLUSÃO

Concluiu-se que o jejum de 48 horas seja por insensibilização com hipotermia ou eletronarcose, estimulam mecanismos imunológicos na tentativa de manter a homeostase e provocam aumento dos processos metabólicos anaeróbios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.A.; SANABRIA-OCHOA, A.I.; GONÇALVES, F.D.; URBINATI, E.C. Stress responses of juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*) after transport in a closed system under different loading densities. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p. 1413-1417. 2008.
- AINSWORTH, A.J.; DEXIANG, C.; WATERSTRAT, P.R.; GREENWAY, T. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*).I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10°C. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 100(4), 907-912. 1991.
- AL-KAHTANI, H.A.; ABU-TARBOUSH, H.M.; BAJABER, A.S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in tilapia and Spanish mackerel. **Journal of Food Science**, v.61, n.4, p.729-733, 1996.
- ARAÚJO, D. M. et al. Hematologia de tilápias-donilo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 3, p. 294-302, 2011.
- ASHLEY, P.J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, 104: 199-235. 2007.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Bolm Inst. Pesca** 32:41-49. 2006.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annu. Rev. Fish Dis.** 1:3-26. 1991.
- BEERS, R.F., SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.

BERNT, E.; BERGMAYER H.U. Lactate dehydrogenase assay. In: BERGMAYER, H.U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. London: Academic, p.141-147. 1974.

BRIGHTMAN, R.I. et al. Energetics of larval red drum, *Sciaenops ocellatus*. Part II. Growth and biochemical indicators. **Fishery Bulletin**, v.95, p.431-444, 1997.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods Enzymol**, v.113, p.484-490. 1985.

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

CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behavior Science**, v.86, p.205-223. 2004.

DIGRE, H.; ERIKSON, U.; SKARET, J.; LEA, P.; GALLART JORNET, L.; MISIMI, E. Biochemical, physical and sensory quality of ice-stored Atlantic cod (*Gadus morhua*) as affected by pre-slaughter stress, percussion stunning and AQUI-STM anaesthesia. **Euro Food Res Technol**, 233: 447-456. 2011.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p. 827-839, 2001.

ESTRADA-GODÍNEZ, J.A.; MALDONADO-GARCÍA, M.; GRACIA-LÓPEZ, V.; CARRILLO, M.; REBOLLAR-PRUDENTE, R.; SPANOPOULOS-ZARCO, M. Efecto del fotoperiodo y la temperatura sobre la composición bioquímica en reproductores silvestres de cabrilla sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) **Lat. Am. J. Aquat. Res.**, 42(1): 85-96. 2014.

EZZAT, A.A.; SHABANA, M.B.; FARGHALY, A.M. Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervais) I. Blood cells. **J. Fish Biol.** 6:1-12. 1974.

FAGUNDES, M. **Estudos fisiológicos e metabólicos do estresse de manejo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*)**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista–UNESP centro de aquicultura da UNESP/Campos de Jaboticabal. SÃO Paulo. 148pp. 2009.

FALCON, D.R.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E., SOLARTE, W.V.N.; GUIMARÃES, I. Leucograma da tilápia-do-Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciênc. Anim. Bras.** 9:543-551. 2008.

FUJIMOTO, R.Y.; CRUZ, C.; MORAES, F.R. Análise de efluente e histologia da pele, fígado e rim de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente. **Bolm Inst. Pesca**, São Paulo, 34(1):117-124. 2008.

GATICA M.C.G.; MONTI, C.; GALLO, T.G.; KNOWLES, C.B.; GALLO. Effects of crowding on blood constituents and flesh quality variables in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Med Vet** 42, 187-193. 2010.

GATICA, M. C.; MONTI, G. E.; KNOWLES, T. G.; GALLO, C. B. Muscle pH, *rigor mortis* and blood variables in Atlantic salmon transported in two types of well-boat. **Veterinary Record** 166: 45-50. 2010.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; BRINN, R. P.; ROUBACH, R.; COPPATI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 256, n. 1-4, p. 521-528. 2006.

GOMES, L.C.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPARRI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; URBINATI, E.C. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Journal of Aquaculture Society** 34, 76-84. 2003.

HOCHACHKA, P. W.; GUPPY, M. Metabolic arrest and the control of biological time. **Harvard University Press**, Cambridge, Mass. 1987.

HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 19, n. 1, p. 7-12, 2000.

INOUE, L.A.K.A.; BOIJINK, C.L.; IBEIRO, P.T.; SILVA, A.M.D.; AFFONSO, E.G. Avaliação de respostas metabólicas do tambaqui exposto ao eugenol em banhos anestésicos. **Acta Amazônica**, vol. 41(2): 327-332. 2011.

INOUE, L.A.K.A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Benzocaína sobre respostas ao estresse do matrinxã submetido ao transporte em sacos plásticos. **Rev. Bras. Saúde Prod.**, v.11, n.3, p.909-918. 2010.

IVERSEN, M., FINSTAD, B. AND NILSSEN, K.J. Recovery from Loading and Transport Stress in Atlantic Salmon *Salmo salar* L. Smolts. **Aquaculture**, 168, 387-394. 1998.

IWAMA, G.; AFONSO, L.; MATHILAKATH, V. Stress in fish. Campbell River: **AquaNet Workshop on Fish Welfare**, 278 p. 2004.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. Academic Press, London. 380p. 1996.

KESTIN, S. C.; VAN DE VIS, J. W.; ROBB, D. H. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 9, p. 113-118, 2002.

KURATA, O.; OKAMOTO, N.; SUZUMURA, E.; SANO, N.; IKEDA, Y. Accommodation of carp natural killer-like cells to environmental temperatures. **Aquaculture**, 129:421-424. 1995.

LEA MASTER B.R.; BROCK J.A.; FUJIOKA, R.S.; NAKAMURA, R.M. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comp. Biochem. Physiol.** 97:525-529. 1990.

LINES, J.A.A.; ROBB, D.H.H.; KESTIN, S.C.C.; CROOK, S.C.C.; BENSON, T. Electric stunning: a humane slaughter method for trout. **Aquac. Eng.** 28, 141–154. doi:10.1016/S0144-8609(03)00021-9. 2003.

LINS, P.G. et al. Effect of indole acetic acid administration on the neutrophil functions and oxidative stress from neutrophil, mesenteric lymph node and liver. **Life Sciences**, v.78, p.564-570, 2006.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK, JR J.; RIBEIRO, K.; YIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Bolm Inst. Pesca** 30:71-80. 2004.

MATUSHIMA E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 33:5-10. 1996.

MOBERG, G.P. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare In: MOBERG, G.P; MENCH, J.A. **The biology of Animal Stress: Basic principles and implications for animal welfare**. California: CABI Publishing, 1- 22p. 2000.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev Fish Biol Fisheries**, v.9, p. 211-268. 1999.

OLIVEIRA, R.F.; GALHARDO, L. Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. **Rev. Bras. Zootecnia**. 36, 77–86. 2007.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Quim. Nova**, 28, 655-663. 2005.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. **Hematologia de peixes**, p.65-70. In: Santos H.S.L. (Ed), *Histologia de Peixes*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, São Paulo. 1991.

- RANZINI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, p.89-120. 2004.
- RAŠKOVIĆ, B.S.; STANKOVIĆ, M.B.; MARKOVIĆ, Z.Z.; POLEKSIĆ, V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **J. Agricult. Sci.** 56(1):87-100. 2011.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do MayGrünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, 20: 329-334. 1947.
- ROSTAMZAD, H.; SHABANPOUR, B.; SHABANI, A.; SHAHIRI, H. Enhancement of the storage quality of frozen Persian sturgeon fillets by using of ascorbic acid. **International Food Research Journal**, v.18, p.109-116, 2011.
- ROTH, B.; GRIMSBØ, E.; SLINDE, E.; FOSS, A.; STIEN, L.H.; NORTVEDT, R. Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and *rigor mortis*. **Aquaculture**, 326- 329: 178-180. 2012.
- SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, p. 231 – 240, 2001.
- SEIFZADEH, M.; MOTALLEBI, A.A.; MAZLOUMI, M.T. Evaluation of fat quality in packaged common tilapia fish soaked in whey protein compared with sodium alginate. **Scholarly Journal Agricultural Science**, v.2, n.2, p. 26-31, 2012.
- SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; PONTE, E.C. Fatores estressantes em peixes. **Revista eletrônica Nitritime**. 6(4): 1001-1017. 2009.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Villimpress, Ribeirão Preto. 144p. 2004.
- TONI, C. et al. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. **Journal of Applied Toxicology**, v.30, p.590-595, 2010.
- TORRES, E. A. F. S.; OKANI, E. T. Teste de TBA: ranço em alimentos. **Revista Nacional da Carne**, v. 243, p. 68-76, 1997.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Sodium chloride added to transport water and physiological responses of Matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, n. 4, p. 569-572. 2006.
- URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: Cyrino, J.E.P. et al. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 171-194. 2004.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects. **Springer-Verlag**, Heidelberg. 1995.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette-Scifen Anstrichmittel**, v.72, p.1084-1087, 1970.

WEISER, W.; LACKENER, R.; HINTERLETNER, S.; PLATZER, U. Distribution and properties of lactate dehydrogenase isozymes in red and white muscle of freshwater fish. **Fish Physiol. Biochem.**, 3: 151-162. 1987.

YONAR, M.E.; SAKIN, F. Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.99, p.226-231, 2011.

CAPÍTULO 3.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA CARNE RESFRIADA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochomis niloticus*) SUBMETIDA A DIFERENTES MANEJOS NO PRÉ-ABATE

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar o efeito de diferentes períodos de jejum combinados a métodos de insensibilização pré-abate, sobre as alterações da qualidade da carne de tilápia do Nilo (*Oreochomis niloticus*). As tilápias foram submetidas à exposição a diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 horas) e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Após a insensibilização as tilápias foram abatidas e então submetidas a análises de rendimentos de carcaça, de filé e de resíduo de filetagem; *rigor mortis*; pH; medidas dielétricas (*Freshness Meter*); bases nitrogenadas voláteis (BNV); cor dos filés (luminosidade - L*, intensidade da cor vermelho-verde - a* e intensidade da cor amarela-azul - b*); e determinação de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e dos seus produtos de degradação (adenosina difosfato – ADP, monofosfato de inosina - IMP, inosina - INO e hipoxantina – Hx). Foi aplicado o delineamento estatístico em esquema fatorial sendo 3 (períodos de jejuns) x 2 (insensibilizações) e seis pontos amostrais (0, 1, 2, 4, 7 e 14 dias) referentes as amostras mantidas sob refrigeração a 3°C. Todos os dados foram submetidos a ANOVA e quando constatada diferença significativa ($p < 0,05$) as médias foram então comparadas pelo teste de Tukey. Peixes insensibilizados por eletronarcose apresentaram filés com aspecto mais amarelado, o que para o consumidor pode ser um aspecto negativo na decisão de compra. Observou-se baixos índices de hipoxantina (Hx) para o grupo sem jejum e insensibilizado por hipotermia e pela determinação do valor K demonstrou-se que os filés estavam em bom estado de frescor até o ultimo dia de análise, podendo ser consumidos sem cozimento. Com base na análise de dados da pesquisa, para manter uma boa qualidade de carne em tilápias do Nilo estocadas refrigeradas até 14 dias, os peixes podem ser submetidos a períodos de até 48h de jejum, seguidos de insensibilizações como hipotermia e eletronarcose.

Palavras-chave: Conservação do pescado; Métodos de insensibilização; Qualidade do filé; Tempos de jejum;

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the effect of different fasting periods combined with pre-slaughter insensitization methods on the quality changes of Nile tilapia (*Oreochomis niloticus*) meat. Tilapia were exposed to different fasting periods (0, 24, 48 hours) and later numb by hypothermia and electronarcosis. After stunning the tilapia were slaughtered and then subjected to carcass, fillet and filleting residue analyzes; *rigor mortis*; pH; dielectric measurements (*Freshness Meter*); volatile nitrogen bases (BNV); fillet color (luminosity - L *, intensity of red-green color - a * and intensity of yellow-blue color - b *); and determination of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and its degradation products (adenosine diphosphate - ADP, inosine monophosphate - IMP, inosine - INO and hypoxanthine - Hx). It was applied the statistical design in a factorial

scheme being 3 (fasting periods) x 2 (numbness) and six sampling points (0, 1, 2, 4, 7 and 14 days) referring to the samples kept under refrigeration at 3 ° C. All data were submitted to ANOVA and when significant difference ($p < 0.05$) was found the means were then compared by Tukey test. Fish insensitized by electronarcosis presented more yellowish fillets, which for the consumer may be a negative aspect in the purchase decision. Low levels of hypoxanthine (Hx) were observed for the fasting and insensitized group due to hypothermia and the K value determination showed that the fillets were in a good state of freshness until the last day of analysis and could be consumed without cooking. Based on research data analysis, in order to maintain good meat quality in Nile tilapia stored refrigerated for up to 14 days, fish may undergo periods of up to 48 hours of fasting, followed by numbness such as hypothermia and electronarcosis.

Keywords: Fish conservation; Stunning methods; Fillet quality; Fasting periods.

1. INTRODUÇÃO

Muitos procedimentos aplicados na aquicultura propiciam condições estressantes aos peixes, como elevada densidade de estocagem, aplicação de uma dieta controlada ou ausência desta, má qualidade da água, práticas de seleção, manejo dos animais, captura, transporte e procedimentos de insensibilização antes do abate (POLI, 2009). Práticas aplicadas no manejo pré-abate de peixes incidem sobre a qualidade da carne e tornam objeto de estudos crescente em todo o mundo.

Segundo Chicrala e Santos (2013) o tempo de esvaziamento do trato digestivo difere conforme a espécie cultivada, variando de 24 a 48 horas para a maioria delas. Recomenda-se aos produtores analisarem qual perfil alimentar dos peixes cultivados em suas pisciculturas (exemplo: herbívoros, carnívoros, filtradores, entre outros), visto que o tamanho do intestino também interfere no tempo de absorção dos alimentos e, obviamente, na excreção, incidindo desta forma em possíveis gastos desnecessários com ração e perda na qualidade da carcaça quando aplicado um jejum extenso (FERREIRA, ARAÚJO, CAMPOS, 2018). Outro problema agregado à má aplicação do jejum está no fato de que um período prolongado pode vir a gerar efeitos negativos como agressão, canibalismo, a perda de peso e de condição física em diversas espécies (CARNEIRO et al., 2009). Portanto, estudos com este tema se tornam relevantes na produção animal.

Outro ponto a ser destacado no pré-abate são os procedimentos de insensibilização, pois o estresse induzido pelo atordoamento pode afetar significativamente a qualidade da carne do peixe para consumo. Esta influência foi estudada com espécies de peixes marinhos (ÖZOGUL; ÖZOGUL, 2004; TULLI et al.,

2015; ERIKSON, 2011), mas há pouca discussão em espécies tropicais continentais. Os procedimentos comerciais de insensibilização mais utilizado em frigoríficos de peixes são a imersão dos animais em solução de água e gelo ou por percussão (ÖZOGUL; ÖZOGUL, 2004; EFSA, 2009), métodos estes que exigem muitos trabalhadores e muito tempo em lidar com um grande volume de peixes. Além disso, um resfriamento rápido ou mesmo um golpe impreciso pode causar danos à carcaça e desclassificação do peixe (QIN et al., 2016).

Com o aumento da produção e consumo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (LOPERA-BARRERO et al. 2011), o interesse em manter sua qualidade tem sido de preocupação crescente para indústrias frigoríficas de processamento de peixe e para pesquisadores. Apesar de existirem estudos de melhoramento na conservação de filés de tilápias (MANO et al., 2000; COZZO et al., 2003; VITAL; FREIRE, 2008), ainda são escassos estudos sobre o efeito dos métodos jejum e de atordoamento sobre a qualidade da tilápia. Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar, através dos parâmetros indicadores de qualidade da carne, os efeitos de diferentes períodos de jejum (0, 24 e 48 horas) combinados a métodos de insensibilização pré-abate (hipotermia e eletronarcose) aplicados em tilápia do Nilo, sendo estocadas refrigeradas por 14 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), sob o protocolo CEUA no. 7758310817.

2.1 Animais e procedimento experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), em Pirassununga - SP. As 54 tilápias (com peso médio de $563,63 \pm 30,24$ g e comprimento de $30,79 \pm 2,19$ cm) foram adquiridas em uma piscicultura comercial e aclimatadas em três tanques de concreto (n = 18) por dez dias antes do início dos experimentos para evitar que o estresse causado pelo transporte pudesse interferir nos resultados dos experimentos.

Após a aclimação, cada lote de peixes foi submetido aos diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 h) e posteriormente seis animais de cada lote foram submetidos a dois métodos de insensibilização sendo: (1) hipotermia - exposição dos animais a uma solução de água e gelo na proporção 1:1 e (2) eletronarcose - exposição dos animais à uma corrente elétrica de 220 volts, 1500 Hz, 3,5 amperes por 15s. A insensibilização foi confirmada pela ausência de reflexos ao estímulo da linha lateral, observação da natação, do equilíbrio, ausência de comportamento de fuga, movimentação do opérculo e pela ausência reflexo vestibulo-ocular, segundo o protocolo proposto por Kestin, Van des Vis e Robb (2002).

Foi realizado a aferição dos parâmetros da qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade) com o auxílio da sonda multiparâmetro Horiba (modelo U-10), antes e após a insensibilização das tilápias expostas aos tratamentos. Posteriormente a isso, as tilápias foram abatidas através do corte das brânquias e feito a sangria em água gelada e as carcaças foram submetidas à biometria e análises laboratoriais.

2.2 Procedimentos pós-abate

Após a biometria, três peixes foram eviscerados e procedeu-se a retirada do filé. No processo de filetagem foi realizado um corte oblíquo atrás da cabeça, retirando-se o filé com pele, no sentido longitudinal. Durante o processamento foram aferidos os seguintes parâmetros: peso total (PT); peso do corpo eviscerado (PCE); peso do filé (sem pele e sem escamas) (PF); peso dos resíduos de filetagem - vísceras (PS). Para a análise do rendimento de carcaça, de filé e de vísceras, foram utilizadas as seguintes equações: Porcentagem de Carcaça (%C) = $PCE \times 100 / PT$; Porcentagem de Filé (%F) = $PF \times 100 / PT$; Porcentagem de Resíduo de filetagem (%S) = $PS \times 100 / PT$ (HONORATO et al., 2014).

O Índice de *rigor mortis* (IRM) foi determinado em cada ponto amostral em (zero) 0, 1, 2, 4, 7 e 14 dias em três peixes de cada tratamento. Foi medido de acordo com Bito et al. (1983) e calculado de acordo com a equação: $IRM = [(Do - D)/Do] \times 100$. Onde: Do = valor da distância que separa a base da nadadeira caudal ao ponto de referência,

imediatamente após a morte e D = valor da distância que separa a base da nadadeira caudal ao ponto de referência nos intervalos de tempos selecionados.

A medida do pH foi realizada em cada ponto amostral, diretamente no músculo do peixe na região dorsal, nos mesmos três peixes inteiros dos de rigor mortis, utilizando um peagâmetro de punção portátil (Sentron 1001 Integrated Sensor Technology). As medidas dielétricas foram realizadas nos peixes de cada tratamento do lado esquerdo em cada ponto amostral, com o auxílio do equipamento Fish Freshness Meter – Distrell's Torrymeter®, o qual converte as medidas elétricas da integridade celular em uma escala de leitura.

A concentração de bases nitrogenadas voláteis (BNV) foi determinada em triplicata utilizando-se três filés de cada tratamento, de acordo com a metodologia de Howgate (1976).

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

As concentrações de ATP e seus produtos de degradação (adenosina difosfato – ADP, adenosina-monofosfato - AMP, monofosfato de inosina - IMP, inosina - INO e hipoxantina – Hx) foram determinadas no músculo dorsal de três tilápias filetadas, de acordo com a metodologia descrita por Burns, Kee, Irvine (1985). Para esta análise nos períodos amostrais foram retirados 1 g de músculo na parte dorsal de três filés esquerdos de cada tratamento. O músculo foi homogeneizado com 10mL de solução de ácido perclórico 0,6M com o auxílio do ultraturrax (IKA-T25) por 20 segundos a 18.000 rpm. A solução foi filtrada em papel filtro (Whatman nº1) e 600µL do filtrado foi retirado e adicionado a 600µL de solução tampão fosfato (pH 7,6) dentro de microtubos tipo eppendorfe, os quais foram centrifugados por 3 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer para o momento da leitura. A leitura foi realizada de acordo com Burns et al. (1985), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC), a fase móvel utilizada foi a solução de KH_2PO_4 a 0,6 M, operando com fluxo de 1,4mL/min em uma coluna analítica de fase

reversa (RP8MPLC). Os padrões utilizados para obter a retenção de cada metabolito foram adquiridos na forma purificada (Sigma Aldrich). O volume exato a ser injetado na coluna variou de acordo com a melhor visualização dos picos (25, 50 e 100 µl). O valor de K, que expressa o estado de degradação, foi calculado de acordo com o Özogul et al. (2006) pela seguinte equação:

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

2.3 Análise estatística

Os valores de rendimento de vísceras e filetagem (%) foram comparadas por delineamento inteiramente casualizado por ANOVA, seguido de Tukey admitindo-se um nível de significância $p < 0,05$. Para as demais análises foi utilizado um esquema fatorial sendo 3 (períodos de jejuns) x 2 (insensibilizações) e seis pontos amostrais (0, 1, 2, 4, 7 e 14 dias), sendo os dados submetidos à análise de variância ANOVA e posteriormente para as médias diferentes foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância a 5%. Nas análises de ATP foram analisadas amostras em sete pontos amostrais (0, 1, 2, 3, 4, 7 e 14 dias), seguindo os preceitos anteriores. Utilizou-se o software SAS (SAS INSTITUTE, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade de água dos tanques manteve-se estável durante a aclimação (pH: 6,56, [O₂]: 8,7 mg.L⁻¹, temperatura 25,3°C) e durante o experimento os valores de pH e oxigênio dissolvido (OD) mantiveram-se estáveis durante toda a aplicação da corrente elétrica e dentro do esperado para a água utilizada nos tratamentos. A salinidade observada no tratamento de eletronarcose (0,02%) ocorreu devido a diluição de NaCl na água onde os peixes foram imersos para a aplicação da corrente com o intuito de melhorar a condutividade elétrica, aumentando assim a eficácia do tratamento. Os resultados podem ser vistos na Tabela 5. Durante o experimento observou-se que houve uma maior demora na insensibilização aparente no jejum 48h (hipotermia) (17 minutos), além de um

leve aumento da temperatura na insensibilização por eletronarcose, porém isso não incidiu no resultado final ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade da água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) das caixas onde foram aplicadas as insensibilizações com hipotermia e eletronarcose das tilápias submetidas a jejuns diferentes.

Tratamento	Insensibilização	Tempo de insensibilização	OD (mg/L)	Temperatura (°C)	Condutividade (μ /cm)	pH	Salinidade (%)
			Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização
Jejum 0h	Hipotermia	15 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,219/0,206	6,15/6,08	0/0
	Eletronarcose	15s	8,23/8,24	24,1/24,5	0,589/0,578	7,04/7,00	0,02/0,02
Jejum 24h	Hipotermia	15 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,222/0,198	6,56/6,44	0/0
	Eletronarcose	15s	8,39/8,39	24,3/24,5	0,632/0,630	6,82/6,82	0,02/0,02
Jejum 48h	Hipotermia	17 min	19,99/19,99	1,2/1,4	0,215/0,227	6,47/6,44	0/0
	Eletronarcose	15s	8,24/8,25	24,1/24,7	0,572/0,569	7,03/7,03	0,02/0,02

Na tentativa de avaliar se a aplicação do pré-abate escolhido (diversidade de tempos de jejuns associado a insensibilizações) poderia vir a influenciar na condição corpórea final das tilápias abatidas, realizou-se a análise de rendimento de carcaça, de filé e de resíduo de filetagem e não foi constatada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos aplicados (Fig. 14).

Figura 14 – Rendimento de carcaça (%C), filé (%F) e das vísceras (%S) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.

Os valores médios de rendimento de filés em todos os tratamentos observados situaram-se inferiores a média esperada, entre 27,0% e 36,0%, segundo Souza et al. (1999) e Araújo, Lima e Santos (2013) em tilápias do Nilo.

De acordo com Armstrong e Schindler (2011), na natureza, alguns peixes onívoros e a maioria dos peixes carnívoros comem uma vez a cada dois dias, e isto sugere que a alimentação uma vez a cada dois dias pode ser aceitável fisiologicamente para a tilápia do Nilo. Além disso, os pesquisadores apontam que o peixe pode adaptar-se anatomicamente e fisiologicamente à alimentação intermitente, aumentando o peso e o volume relativo do estômago e permitindo que os peixes comam mais quando os alimentos estão disponíveis (OYEDEJI; ATTEH, 2005; MATTILA et al., 2009). Possivelmente as tilápias deste experimento começaram a usar suas reservas corporais para suprir suas necessidades calóricas durante o período de jejum aplicado, não alterando de modo significativo a estrutura corporal no momento imediato pós-abate.

Como um importante indicador para a avaliação do *rigor mortis* e estresse pré-morte, o IR variou nos tratamentos aplicados (Fig. 15). É possível observar que os resultados apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na medição do primeiro dia de estocagem (3 horas de armazenamento resfriado), onde os tratamentos que não tiveram a restrição alimentar submetidos à hipotermia e eletronarcose tiveram valores menores que os demais. Este fato provavelmente ocorreu devido ao alto consumo de energia do ATP em etapas que antecedem o abate, portanto o índice de *rigor mortis* pode ser um indicador do estado de estresse sofrido pelo animal no pré-abate (ACERETE et al., 2009). Outro ponto a ser observado é que os tratamentos submetidos à hipotermia apresentaram índices menores que os de eletronarcose, o que pode ser explicado pela maior atividade muscular pré-morte causada por danos nas brânquias apresentada pelas tilápias (a atividade muscular é considerada correlacionada com o dano no tecido muscular), que resultou em mais tempo para atingir o rigor total (GASCO et al., 2014).

O grupo submetido ao jejum 48h/hipotermia e eletronarcose saiu do estado de rigor mais rápido que os demais tratamentos ao fim dos 14 dias de armazenamento resfriado. Esses dois grupos nos primeiros quatro dias tiveram uma rápida entrada no rigor quando comparado ao grupo sem jejum e jejum de 24h, possivelmente devido ao processo de acidificação causada pela produção de ácido láctico no tecido muscular durante a fase que antecede a morte, estimulado pelo jejum intenso. O estresse prévio e a

grande atividade física aos métodos de insensibilização podem ter elevado o consumo das reservas de glicogênio muscular à custa de ATP nesses grupos (BAGNI et al., 2007).

Figura 15 – Índice de *rigor-mortis* (IRM%) em tilápias submetidas a jejuns diferentes e insensibilizadas por hipotermia (H) e eletronarcose (E) refrigeradas por 14 dias. Letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. Média $\pm$ erro padrão.

Neste trabalho os menores valores de pH foram entre os tratamentos que receberam o jejum 48h/hipotermia ($6,55\pm0,08$) e eletronarcose ($6,51\pm0,10$) inicialmente; e ao término do período de armazenamento estes mesmos tratamentos também tiveram baixas médias de valores de pH, $6,04\pm0,05$ e $5,98\pm0,05$, respectivamente (Tabela 6). Este valor de pH significativamente menor pode ter sido devido à presença abundante de ácido fosfórico produzido pela rápida degradação do ATP no grupo submetido ao maior período de jejum (ZHANG et al., 2017). Os resultados mostram também que dentro de dois dias de armazenamento todos os tratamentos tiveram uma redução de seus valores, assim como encontrado por Lefèvre et al. (2008) que reportaram que a redução significativa do pH muscular em peixes ocorre entre 24 e 48 horas pós-morte.

Pesquisas apontam que o estresse de práticas pré-abate influencia diretamente o pH muscular (BAHUAUD et al., 2010; GATICA et al., 2010) alterando as propriedades físicas do músculo dos peixes e consequentemente sua qualidade. Hultmann et al., (2012) encontraram diferenças ($p<0,05$) nos valores de pH muscular de bacalhau comparando peixes estressados e não estressados. Gatica et al., (2010), também observaram diferença

($p < 0,05$) no pH muscular do salmão estressados quando comparados ao controle. Duran et al. (2008) abatendo carpas (*Cyprinus carpio*) encontraram valores iniciais de pH muscular aplicando a insensibilização por percussão craniana entre 6,46 e 6,81, e notaram que após 24h de abate ocorreram reduções nos valores de pH muscular, devido ao acúmulo de ácido lático no músculo e o mesmo ocorreu neste trabalho onde todos os tratamentos tiveram valores decrescentes 24 horas pós-abate e armazenamento até o final do experimento (Tabela 6).

Tabela 6 – Dados pH em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.

Tratamentos	Jejum 0h		Jejum 24h		Jejum 48h	
Estocagem (dias)	H ^A	E ^A	H ^A	E ^A	H ^B	E ^B
0	6,71±0,22 ^a	6,74±0,25 ^a	6,72±0,22 ^a	6,73±0,05 ^a	6,55±0,08 ^a	6,51±0,10 ^a
1	6,67±0,15 ^a	6,73±0,04 ^a	6,54±0,05 ^a	6,58±0,16 ^a	6,51±0,08 ^a	6,48±0,08 ^a
2	6,49±0,04 ^a	6,44±0,02 ^b	6,47±0,05 ^{ab}	6,45±0,12 ^a	6,32±0,12 ^b	6,32±0,12 ^b
4	6,41±0,15 ^{ab}	6,38±0,12 ^b	6,32±0,05 ^b	6,41±0,13 ^a	6,27±0,14 ^b	6,27±0,08 ^b
7	6,38±0,05 ^b	6,36±0,05 ^b	6,31±0,05 ^b	6,27±0,05 ^b	6,17±0,05 ^c	6,12±0,08 ^c
14	6,26±0,08 ^b	6,21±0,05 ^c	6,21±0,05 ^c	6,21±0,05 ^b	6,04±0,05 ^d	5,98±0,05 ^d

Valores são médias das triplicatas por grupo $\pm$ EP. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos de exposição ao mesmo tratamento; letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Sobre as medidas dielétricas não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Fig. 16). As medidas dielétricas dos peixes permaneceram praticamente constantes até o 4º dia de armazenamento (12,88 a 12,81 para jejum 0h/hipotermia; 12,89 a 12,82 para jejum 0h/electronarcose; 12,83 a 12,82 para jejum 24h/hipotermia; 12,84 a 12,81 para jejum 24h/electronarcose; 12,82 a 12,79 para jejum 48h/hipotermia; 12,81 a 12,75 para jejum 48h/electronarcose), porém ao final do 14º dia da armazenagem refrigerada o tecido muscular do pescado vai ficando mais macio perdendo a capacidade de condutividade elétrica e talvez por isso tenha decaído os valores, mas não havendo diferença entre os tratamentos.

Figura 16 – Medida dielétrica no músculo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronnarcose.

A determinação de Bases Nitrogenadas Voláteis tem sido uma medida utilizada como indicador de qualidade dos produtos pesqueiros armazenados em gelo e quantificam os compostos voláteis básicos como a amônia, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, entre outros (RAWDKUEN et al., 2010). A técnica também é amplamente empregada para espécies de água doce. Batista et al. (2004) determinaram o teor de BNV em matrinxã, e Oliveira (2007) com o pirarucu também utilizou o BNV no estudo de vida útil dessa espécie. Neste estudo as bases nitrogenadas voláteis foram aferidas em filés resfriados de tilápia do Nilo e constatadas diferenças ($p < 0,05$) inicialmente (dia 0) onde os menores índices do composto foram encontrados nos tratamentos que não tiveram restrição alimentar e com jejum de 24h, ambos submetidos à insensibilização por hipotermia ($7,56 \pm 0,18$ e $7,83 \pm 0,28$ mg/100g). Ao final dos 14 dias de armazenamento refrigerado observou-se que todos os tratamentos tiveram aumento gradual da concentração do composto, indicando índices mais elevados a final do experimento nos tratamentos jejum 48h/elettronnarcose ($14,53 \pm 0,16$ mg/100g), jejum 24h/elettronnarcose ($14,17 \pm 0,15$ mg/100g), jejum 0h/elettronnarcose ($14,07 \pm 0,54$ mg/100g) e jejum 48h/hipotermia ($13,57 \pm 0,35$ mg/100g) (Tabela 7).

Tabela 7 – BNV no músculo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.

Tratamentos	Jejum 0h		Jejum 24h		Jejum 48h	
	H ^A	E ^B	H ^A	E ^B	H ^A	E ^B
Estocagem (dias)						
0	7,56±0,18 ^a	8,89±0,12 ^a	7,83±0,28 ^a	8,84±0,28 ^a	8,82±0,11 ^a	9,01±0,15 ^a
1	7,84±0,25 ^a	8,89±0,15 ^a	7,89±0,12 ^a	8,88±0,16 ^a	8,92±0,12 ^a	9,01±0,11 ^a
2	8,32±0,22 ^b	9,03±0,05 ^b	8,12±0,41 ^b	9,03±0,15 ^{ab}	9,34±0,18 ^b	9,81±0,26 ^b
4	9,01±0,22 ^c	10,82±0,34 ^c	8,62±0,28 ^b	9,71±0,25 ^b	10,79±0,15 ^c	11,45±0,36 ^c
7	10,78±0,25 ^d	11,16±0,34 ^d	10,01±0,28 ^c	12,04±0,15 ^c	12,01±0,25 ^d	12,71±0,26 ^d
14	12,27±0,25 ^e	14,07±0,54 ^e	12,39±0,28 ^d	14,17±0,15 ^d	13,57±0,35 ^e	14,53±0,16 ^e

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

Em relação à hipotermia constatou-se que este método de abate apresentou valores menores, comparados com os peixes insensibilizados por eletronarcose (Tabela 7). Isso pode estar relacionado com a diferença de temperatura entre os métodos de insensibilização aplicados neste trabalho, pois os peixes abatidos por hipotermia eram colocados em água e gelo com temperatura próxima a 0°C, diminuindo imediatamente a temperatura do seu corpo, enquanto os insensibilizados por eletronarcose permaneceram na temperatura ambiente por algum tempo, até serem abatidos e filetados, e só aí foram estocados em gelo demorando mais tempo para que ocorresse a queda da temperatura do seu corpo. A brusca diminuição da temperatura imediatamente após a morte, evita ou retarda as ações químico-enzimáticas envolvidas no processo de autólise como também o desenvolvimento de micro-organismos que contribuem para a deterioração do alimento (GOMES, 2006).

Segundo Siqueira (2001) e Savay et al. (2008) os teores das bases nitrogenadas voláteis aumentam relativamente com a deterioração, como também ocorrido neste trabalho. Isto é atribuído à ação enzimática que ocorre no músculo e possivelmente pela quantidade de bactérias presentes capazes de produzir compostos nitrogenados, como amônia e aminas voláteis, que levam à deterioração do pescado mais rapidamente, pois aumentam gradualmente com o tempo de armazenamento.

De acordo com Ogawa e Maia (1999) peixes com excelente estado de frescor podem ter os teores de BNV entre 5 a 10 mg/100g, peixes com frescor razoável podem atingir 15 a 25 mg/100g, e na concentração de 30 a 40 mg/100g já mostram o início do

estado de putrefação, e em níveis acima de 50 mg/100g o pescado encontra-se deteriorado. A Legislação Brasileira designa que o pescado fresco destinado para o consumo humano deve apresentar limite máximo de 30 mg/100g de BNV (BRASIL, 2001). Os resultados do presente estudo estão abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação, podendo então ser comercializados ao longo de 14 dias sob refrigeração como peixes em bom estado de frescor.

Para os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^*) (Fig. 17) houve diferença significativa ($p < 0,05$) para luminosidade (L^*), comparando a partir do dia 1 para o tratamento submetido ao jejum 48h/hipotermia ($52,92 \pm 1,12$) e eletronarcose ($52,89 \pm 1,15$), que apresentaram menores índices de luminosidade. Para o vermelho (a^*) não houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo que todos seguiram com o declínio conforme aumento do tempo de estocagem. Para a intensidade de amarelo (b^*) houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos tratamentos submetidos à eletronarcose sem restrição alimentar até às 24 horas de armazenamento, havendo maiores índices destes e posteriormente houve diminuição gradual de todos os tratamentos até o final do experimento (Fig. 17). A cor amarelada não tem qualquer efeito sobre a qualidade da carne do peixe, mas esta pode parecer “anormal” ao consumidor, ou seja, a percepção estética é afetada (YAGIZ et al., 2007; TRUONG et al., 2016). Infelizmente não há como impedir a formação desta cor que também pode estar presente devido a composição da ração a qual os peixes foram submetidos. Em alguns casos, a tonalidade amarelada pode diminuir ou desaparecer com o cozimento da carne.

Figura 17 – Cor nos filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.

De uma forma geral, o mercado consumidor espera que a carne de peixe de água doce seja branca e luminosa. Ressalta-se que a cor da carne dos peixes é um dos principais parâmetros avaliados pelos consumidores (KNOWLES et al., 2008). Em turbot (*Psetta máxima*) ou carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) submetidos ao atordoamento por água e gelo ou choque elétrico não foram observadas diferenças nos parâmetros de luminosidade (L^*), intensidade da cor vermelha-verde (a^*) e intensidade da cor amarela-azul (b^*) dos filés (SCHERER, 2005; KNOWLES et al., 2008). Igualmente, Roth, Slinde e Robb (2006) também não observaram variações na luminosidade (L^*) dos filés de salmões (*Salmo salar*) submetidos ao choque elétrico ou percussão craniana.

Independente da alimentação intermitente e dias de jejum associado com a insensibilização, todos os resultados tendem a diminuir ao longo do tempo, mostrando diminuição gradativa dos valores ao longo do tempo de armazenamento. A descoloração do músculo, como observado neste trabalho, também foi relatada em outras espécies de peixes como os salmonídeos (ROBB; KESTIN; WARRIS, 2000). Reduções na quantidade de vermelho e amarelo, semelhantes às encontradas neste trabalho, foram

relatadas por Álvarez et al. (2008) em outros peixes (sargo) com sete dias de armazenamento, assim a acidificação da glicólise anaeróbica durante o armazenamento pode afetar a cor do filé.

Bjørnevik e Solbakken (2010), avaliando filés de bacalhau (*Gadus morhua*) submetidos ao efeito do estresse e sem estresse, observaram que no dia do abate e após 8 dias de armazenamento não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para o parâmetro de luminosidade, enquanto que em experimento com filés resfriados de pargo (*Pagrus auratus*) pesquisadores observaram que para os três parâmetros (L^* , a^* b^*) ocorreram queda nos valores. Acredita-se que a perda de intensidade da cor nos filés pode estar correlacionada com a temperatura de armazenamento e a bioquímica do tecido (TUCKEY; FORGAN; JERRETT, 2012).

O conteúdo de ATP e dos seus catabólitos encontrados neste estudo não apresentaram diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos, com exceção de Hx ($p<0,05$) onde o melhor tratamento, ou seja, aquele que apresentou menores índices deste composto ao longo do período de estocagem foi o grupo de tilápias sem jejum insensibilizado por hipotermia. O aparecimento da hipoxantina indica o início da deterioração microbiológica e alterações autolíticas sofridas no músculo, portanto é comumente utilizada como indicador de frescor no pescado, devido à sua boa correlação com o tempo de armazenamento (OCAÑO-HIGUERA et al., 2011). Neste trabalho a insensibilização aparente por choque térmico parece causar um efeito menos deletério para com as alterações microbiológicas e autolíticas ao longo dos 14 dias de armazenamento do que o choque elétrico, isso talvez pelo fato do gelo diminuir ou estabilizar ações de micro-organismos deteriorantes, mas não impede que haja produção de compostos químicos naturalmente deteriorantes visto que ao longo do tempo houve um aumento da taxa de Hx para todos os tratamentos (Fig. 18).

Figura 18 – Mudanças da degradação do ATP e valor K de filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcore durante 14 dias de armazenamento sob refrigeração. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos estudados.

Foi também observado que em IMP os tratamentos submetidos à insensibilização por eletronarcore tiveram índices mais elevados deste composto, enquanto do 7º para o 14º dia de estocagem dos grupos insensibilizados por hipotermia tiveram um decréscimo dos índices. Vale ressaltar que este é um composto que atua realçando o sabor do pescado, e pode vir a conferir um sabor amargo à carne, sendo um contribuinte para o *off-flavor* no

pescado (ÖZOGUL; ÖZOGUL, 2004). Portanto, as amostras submetidas à eletronarcose se caso fossem consumidas poderiam carrear um sabor desagradável ao consumidor.

O valor K pode ser usado como indicador de qualidade para o consumo do peixe. Alguns limites do valor K para a carne de peixes são tabelados, onde: < 5% peixes recém-mortos (sem sofrimento), < 20% pode ser ingerido cru como sushi e sashimi, 20 a 60% precisa ser aquecido para o consumo, 60 a 80 % mostra sinais de putrefação (OGAWA; MAIA, 1999). Observando os dados constata-se que o melhor tratamento (aquele que manteve menor valor ao longo do tempo de estocagem foi o tratamento sem jejum/hipotermia. Porém, todas as amostras dos tratamentos até o 14º dia poderiam ser servidas sem cozimento, pois tiveram valores menores de 20%.

4. CONCLUSÃO

O jejum de tilápias por um período de 48h associado a uma insensibilização demorada (hipotermia) ou agressiva (alta voltagem/tempo de choque) afetam a qualidade da carne de tilápia armazenada por um período de até 14 dias, aumentando os processos metabólicos e acelerando os processos de degradação. Apesar disso, os resultados aqui apresentados provam também que os processos aplicados atenderam requisitos pré-estabelecidos na Legislação Brasileira vigente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ÁLVAREZ, A.; GARCÍA GARCÍA, B.; GARRIDO, M.D.; HERNÁNDEZ, M.D. The influence of starvation time prior to slaughter on the quality of commercial-sized gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage. **Aquaculture** 284, 106–114. 2008.

ARAÚJO, T.M.; LIMA,D.M.C.P.; SANTOS,D.S.G.I. Avaliação do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando diferentes modos de filetagem. **XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX**. 3 p. Recife. 2013.

ARMSTRONG, J.B.; SCHINDLER, D.E. Excess digestive capacity in predators reflects a life of feast and famine. **Nature** 476, 84–87. 2011.

BAGNI, M.; CIVITAREALE, C.; PRIORI, A.; BALLERINI, A.; FINOIA, M.; BRAMBILLA, G.; MARINO, G. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.263 (1-4), p. 52–60, 2007.

BAHUAUD, D.; MØRKØRE, T.; LANGSRUD, Ø.; SINNES, K.; VEISETH, E.; OFSTAD, R.; THOMASSEN, M.S. Effects of -1.5°C Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor Fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. **Food Chemistry** 111, 329-339. 2008.

BATISTA, G.M.; LESSI, E.; KODAIRA, M.; FALCÃO, P.T. Postmortem biochemical changes in matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) coming from the fish, kept in ice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24 (4): 573-581. 2004.

BITO, M.; YAMADA, K.; MIKUMO, Y.; AMANO, K. Studies on rigor mortis of fish – I. Difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's method. **Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.**, n. 109, p. 89-96, 1983.

BJØRNEVIK, M.; SOLBAKKEN, V. Pre slaughter stress and subsequent effect on flesh quality in farmed cod. **Aquaculture Research**, v. 41, p.467–474, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2001. **Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001** – Diário Oficial da União 10 de janeiro de 2001, seção 1.

CARNEIRO, P. C. F.; KAISELER, P. H. S.; SWAROFKY, E. A. C.; BALDISSEROTTO, B. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. **Neotropical Ichthyology**, 7(2), 283-288. 2009.

CHICRALA, P. C. M. S.; SANTOS, V. R. V. Piscicultura de Água doce - Multiplicando Conhecimentos. In: Ana Paula Oeda Rodrigues; Adriana Ferreira Lima; Anderson Luis Alves; Daniele Kloppel Rosa; Lucas Simon Torati; Viviane Rodrigues Verdolin dos Santos. (Org.). **Piscicultura de Água doce - Multiplicando Conhecimentos**. 1ed. Brasília: Editora Embrapa, v. 1, p. 379-397. 2013.

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

COZZO, A.Z. et al. Effects of irradiation and refrigeration on the nutrients and shelf-life of tilapia. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.12, n.3, p.85-102, 2003.

DURAN, A.; ERDEMLI, U.; KARAKAYA, M.; YILMAZ, M.T. Effects of slaughter methods on physical, biochemical and microbiological quality of rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) filleted in pre in or post rigor periods. **Fisheries Science**, v.74, p.1146–1156, 2008.

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific opinion of the AHWA Panel on the welfare aspects of the main systems of stunning and killing the main commercial species of animals. **The EFSA Journal**, 45, 1-29. 2004.

ERIKSON, U. Assessment of different stunning methods and recovery of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*): Isoeugenol, nitrogen and three levels of carbon dioxide. **Animal Welfare**, 20, 365–375. 2011.

FERREIRA, N. A. F.; ARAÚJO, R. V.; CAMPOS, E. C. Boas práticas no pré-abate e abate de pescado. **Pubvet**. v.12, n.7, a137, p.1-14, Jul., 2018.

GASCO, L.; GAI, F.; ROTOLO, L.; PARISI, G. Effects of different slaughtering methods on rigor mortis development and flesh quality of tench (*Tinca tinca*). **Journal of Applied Ichthyology**, 30, 58–63. 2014.

GATICA, M.C.G.; MONTI, C.; GALLO, T.G.; KNOWLES, C.B.; GALLO. Effects of crowding on blood constituents and flesh quality variables in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Med Vet** 42, 187-193. 2010.

GOMES, L.M. **Influência das condições de manuseio e conservação na qualidade do pescado**. Trabalho de conclusão de curso. Instituto Qualittas de pós-graduação em Medicina Veterinária. São Paulo, p.43. 2006.

HONORATO, C.A.; SMERMAN, W.; ANGÉLICI, A.F.; DAL BEM, C.R. Efeito das classes de peso sobre o rendimento de processamento de tucunaré (*Cichla* sp.). **Sci. Agrar. Paran.** Marechal Candido Rondon, v.13, n.1, p. 65-70, 2014.

HULTMANN, L.; PHU, T.M.; TOBIASSEN, T.; ASS-HANSEN, O.; RUSTAD, T. Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Food Chemistry**. 134 (2012) 1399–1408. 2012.

KESTIN, S. C.; VAN DE VIS, J. W.; ROBB, D. H. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 9, p. 113-118, 2002.

KNOWLES, T. G. et al. Effect of electrical stunning at slaughter on the carcass, flesh and eating of farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Research**, v. 38, p. 1732-1741, 2008.

LEFEVRÉ, F., BUGEON, J., AUPERIN, B., AUBIN, J. Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. **Aquaculture**, v. 284, p.81–89, 2008.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; MENDEZ, L. D. V.; POVEDA-PARRA, A. R.; DIGMAYER, M. As principais espécies produzidas no Brasil.

In: **Produção de organismos aquáticos: uma visão no Brasil e no mundo**, Guaíba: Agrolivros, Guaíba, RS, p. 143-206. 2011.

MANO, S.B. et al. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. **Food Microbiology**, v.17, n.6, p.657-669, 2000.

OCAÑO-HIGUERA, V.; MAEDA-MARTINEZ, A.; MARQUEZ-RIOS, E.; CANIZALES-RODRIGUEZ, D.; CASTILLO-YAÑEZ, F.; RUIZ-BUSTOS, E.; GRACIANO-VERDUGO, A.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. **Food Chemistry**, v.125, n.1, p. 49–54, 2011.

OCHREM, A. S.; ZAPLETAL, P.; MAJ, D.; GIL, Z.; ZYCHLINSKA-BUCZEK, J. Changes in physical and dielectrical properties of carp meat (*Cyprinus carpio*) during cold storage. **Journal of Food Process Engineering**, v.37 p.177–184, 2014.

OGAWA. M; MAIA E.L. **Manual de Pesca: Ciência de Tecnologia do Pescado**. São Paulo : Livraria Varela, 429p. 1999.

OLIVEIRA, P. R. 2007. **Qualidade do pirarucu (*Arapaima gigas*) procedente de piscicultura estocado em gelo, congelados e de seus produtos derivados**. Tese (Doutorado). PPG Biologia de Água Doce e Pesca Interior- UFAM /INPA. 130 pp.

OYEDEJI, J.O.; ATTEH, J.O. Response of broilers to feeding manipulations. **Int. J. Poult. Sci.** 4, 91–95. 2005.

ÖZOGUL, F.; GÖKBULUT, C.; ÖZOGUL, Y.; ÖZYURT, G. Biogenic amine production and nucleotide ratios in gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, wrapped in aluminium foil and wrapped in cling film at 4°C. **Food Chemistry**, 98, 76–84. 2006.

ÖZOGUL, Y.; ÖZOGUL, F. Effects of slaughtering methods on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored in ice and MAP. **European Food Research and Technology**, 219, 211–216. 2004.

POLI, B. M. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. **Italian Journal of Animal Science**, v.8, p.139–160, 2009.

QIN, Na et al. Effects of different stunning methods on the flesh quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets stored at 4°C. **Food chemistry**, v. 201, p. 131-138, 2016.

RAWDKUEN S, JONGJAREONRAK A, PHATCHARAT S, BENJAKUL S. Assessment of protein changes in farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscles during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, n.5, p.985–994, 2010.

ROBB, D.H.F.; KESTIN, S.C.; WARRIS, P.D. Muscle activity at slaughter: changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. **Aquaculture** 182, 261–269. 2000.

ROTH, B.; SLINDE, E.; ROBB, D. H. F. Field evaluation of live chilling with CO₂ on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 799-804, 2006.

SAS INSTITUTE. **Procedure guide for personal computers**. 5. ed. Cary, 334 p. 1999.

SAVAY DA SILVA, L. K.; RIGGO, R.; MARTINS, P.E.; GALVÃO, J.A.; OETTERER, M. Otimização e padronização do uso de metodologia para a determinação de bases nitrogenadas voláteis totais (BNVT) em camarão (*Xyphopenaeus kroyeri*). **Brazilian Journal of Food and Technology**. Campinas, VII BMCFB. Preprint Series, n.20, p. 138-144. 2008.

SCHERER, R. Effect of slaughter method on postmortem changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) stored in ice. **Journal of FoodScience**, v. 70, p. 348-354, 2005.

SIQUEIRA, A.A.Z.C. **Efeitos da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura —Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 137p. 2001.

SOUZA, M.L.R. et al. Influência do método de filetagem e categorias de peso sobre rendimento de carcaça da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Rev. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 28, p. 1-6, 1999.

TRUONG, B. Q.; BUCKOW, R.; NGUYEN, M. H.; STATHOPOULOS, C. E. High pressure processing of barramundi (*Lates calcarifer*) muscle before freezing: the effects on selected physicochemical properties during frozen storage. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 72-78, 2016.

TUCKEY, N. P. L.; FORGAN, L. G.; JERRETT, A. R. Fillet colour correlates with biochemical status in Australasian snapper (*Pagrus auratus*) during storage in refrigerated seawater. **Aquaculture**, v.356-357, p.256–263, 2012.

TULLI, F.; FABBRO, A.; D'AGARO, E.; MESSINA, M.; BONGIORNO, T.; VENIR, E., et al. The effect of slaughtering methods on actin degradation and on muscle quality attributes of farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Food Science and Technology**, 52, 7182–7190. 2015.

VITAL, H.C.; FREIRE, M. Jr. A irradiação de alimentos. In: ROSENTHAL, A. **Tecnologia de alimentos e inovação: tendências e perspectivas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Cap.11, p.1-193. 2008.

YAGIZ, Y.; KRISTINSSON, H. G.; BALBAN, M. O.; MARSHALL, M. R. Effect of high-pressure treatment on the quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mahi mahi (*Coryphaena hippurus*). **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 509-515, 2007.

ZHANG, L. et al. The impact of stunning methods on stress conditions and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at 4°C during 72 h postmortem. **Food chemistry**, v. 216, p. 130-137, 2017.

CAPÍTULO 4.

ESTABILIDADE DA QUALIDADE DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochomis niloticus*) CONGELADA E SUBMETIDA A DIFERENTES MANEJOS NO PRÉ-ABATE

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo analisar o efeito de diferentes períodos de jejum combinados a métodos de insensibilização pré-abate, sobre as alterações da qualidade do filé de tilápia do Nilo (*Oreochomis niloticus*) mantidas sob congelamento. As tilápias foram submetidas à exposição a diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 horas) e posteriormente insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Após a insensibilização as tilápias foram abatidas e então submetidas a análises de pH; cor dos filés (sistema de cores CIE L*, a*, b*) bases nitrogenadas voláteis (BNV); oxidação lipídica (TBARS); perda de água por descongelamento (*drip loss*); capacidade de retenção de água (CRA). As amostras foram estocadas a -18°C durante 120 dias, sendo mensalmente submetidas a análises. O delineamento estatístico foi um esquema fatorial sendo 4 (períodos de jejuns) x 2 (insensibilizações) e cinco pontos amostrais (0, 30, 60, 90 e 120 dias). Todos os dados foram submetidos a ANOVA e quando constatada diferença significativa ($p < 0,05$) as médias foram então comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados para pH apontaram que houve maior diferença ($p < 0,05$) no tratamento jejum 48h/electronarcose e houve diferença na relação tratamento x tempo, mais acentuada nos 60º e 90º dias de armazenamento. Na intensidade da cor houve efeito entre os tratamentos, sendo os grupos submetidos à eletronarcose inferiores aos demais (coloração mais escura) em L*, além disso durante o processo de filetagem verificou-se uma tendência à coloração vermelha desses filés, observação confirmada pelos escores na intensidade da cor a*. Os valores de BNV durante o período de estocagem a -18°C não alcançaram o limite de 30 mg de BNV/100 g estabelecido pela legislação brasileira para pescado congelado. Para TBARS observou-se que a privação alimentar afeta significativamente o aumento do estresse oxidativo - peroxidação lipídica. Observou-se uma relação inversamente proporcional nos valores de *drip loss* e CRA ao longo do tempo de estocagem, mas não houve diferença entre os tratamentos. As metodologias pré-abate utilizadas neste estudo mostraram resultados para qualidade do filé de tilápia do Nilo congelado dentro dos padrões de normalidade segundo a legislação brasileira, porém, diante do efeito dos tratamentos na coloração dos filés da tilápia recomenda-se aplicar um jejum de até 48 horas submetidos a hipotermia.

Palavras-chave: Armazenamento do pescado; Dias de estocagem do pescado; Estresse pré-abate; Qualidade de filé de tilápia.

ABSTRACT

The objective of the present study was to analyze the effect of different fasting periods combined with pre-slaughter desensitization methods on changes in the quality of Nile tilapia (*Oreochomis niloticus*) kept under freezing conditions. The tilapias were submitted to exposure to different periods of fasting (0, 24, 48 hours) and later stunning by

hypothermia and eletronarcosis. After the stunning the tilapia were slaughtered and then submitted to pH analysis; color of fillets (CIE color system L*, a*, b*) volatile nitrogen bases (BNV); lipid oxidation (TBARS); loss of water by thawing (drip loss); water holding capacity (CRA). The samples were stored at -18°C for 120 days and analyzed monthly. The statistical design was a factorial scheme, with 4 (fasted periods) x 2 (desensitizations) and five sample points (0, 30, 60, 90 and 120 days). All data were submitted to ANOVA and when a significant difference was found ($p < 0.05$) the means were then compared by the Tukey test. The results for pH indicated that there was a greater difference ($p < 0.05$) in the fasting treatment 48h/eletronarcosis and there was a difference in the relation treatment x time, more pronounced in the 60th and 90th days of storage. In the intensity of the color, there was an effect among the treatments, with the groups submitted to eletronarcosis inferior to the others (darkest coloration) in L*, and during the filleting process there was a tendency to the red coloration of these fillets, observation confirmed by the scores in the intensity of the color a*. BNV values during the storage period at -18°C did not reach the limit of 30mg of BNV/100g established by the Brazilian legislation for frozen fish. For TBARS it was observed that dietary deprivation significantly affects the increase of oxidative stress - lipid peroxidation. An inversely proportional relationship was observed in the values of drip loss and CRA over the storage time, but there was no difference between the treatments. The pre-slaughter methodologies used in this study showed results for the quality of fillet of frozen Nile tilapia within the norms of normality according to the Brazilian legislation, however, before the effect of the treatments in the coloring of the fillets of the tilapia it is recommended to apply a fast of ate 48 hours undergoing hypothermia.

Keywords: Fish storage; Days of stocking of fish; Pre-slaughter stress; Quality of tilapia fillet.

1. INTRODUÇÃO

A demanda do mercado de peixes estimulam produtores a procurarem ferramentas ligadas à gestão e tecnologia que possam vir a contribuir na oferta de um produto final de alta qualidade, além de atender a um público que cobra por condições humanitárias na criação animal (SUBASINGHE, 2005).

A aquicultura ética e sustentável considera o bem-estar dos peixes, mas há pouca informação sobre o efeito do manuseio de rotina ou demais procedimentos voltados para o bem-estar, por exemplo, das tilápias do Nilo, apesar de ser um das mais importantes espécies na produção brasileira (ROBB, 2008; BERMEJO-POZA, 2015; KUBITZA, 2011).

Um exemplo dos efeitos de um procedimento de rotina pouco descrito é o jejum, realizado em várias situações incluindo classificação de tamanho e manuseio antes do abate. Jejum antes do abate tem como justificativa esvaziar o intestino e diminuir os

resíduos do tanque (ROBB, 2008). Reduzindo a quantidade de ração e por consequência havendo menor quantidade de fezes no sistema digestivo, a atividade da enzima digestiva é reduzida no peixe ainda vivo e então no pós-abate acredita-se que o processo de deterioração desacelera após o *rigor mortis* ser instalado. Em contrapartida o jejum pode aumentar os níveis de estresse e se esses níveis forem altos o suficiente, o início e a permanência do *rigor mortis* pode ser alterada vindo a ser deteriorado mais cedo (BERMEJO-POZA, 2015).

Os métodos de insensibilização são reconhecidos como um passo crucial que influencia a qualidade do peixe para consumo (RASCO; DOWN; OVISSIPOUR, 2015), etapa também realizada no pré-abate. De acordo com o parecer do European Food Safety Association, o atordoamento para a criação peixes deve ser realizado de maneira apropriada, o que requer uma rápida perda de sensibilidade e consciência em termos de bem-estar dos peixes (EFSA, 2009). Estresse causado pela ansiedade e sofrimento durante os procedimentos de insensibilização levam a alterações hormonais, bioquímicas, osmorreguladoras, imunológicas e energéticas, nas quais a glicólise plasmática e anaeróbica secreta o cortisol, seguido pela formação de ácido láctico, e mudanças na atividade muscular pode posteriormente afetar a qualidade dos filés de peixe (BARTON, 2002; ZHANG et al., 2017).

Quando os peixes são confrontados com estímulos externos, o estresse induzido pelo processo de atordoamento afeta significativamente os atributos da qualidade muscular (DIGRE et al., 2011) e na degradação proteica (TULLI et al., 2015), em várias espécies de peixes sob diferentes condições de armazenamento. No entanto, efeitos de diferentes atordoamentos sobre as mudanças do *rigor mortis* foram raramente investigados. Alterações bioquímicas *post-mortem* estão fortemente correlacionados ao estresse durante o procedimento de insensibilização (ZHANG et al., 2017).

Após o abate, é necessário assegurar o máximo do frescor para manter a carne palatável e segura ao consumidor, caso este não consuma o produto a fresco, portanto é necessário aplicar medidas viáveis a prolongar o estado de frescor bem como a vida útil do produto (CAMPUS et al., 2010). A conservação do pescado pode retardar o crescimento microbiano e as atividades metabólicas *post mortem* dos tecidos, controlar as reações químicas deteriorativas, incluindo o escurecimento enzimático oxidativo, a oxidação de lipídeos e as alterações químicas associadas à degradação de cor, além de controlar a autólise do pescado e evitar a perda de nutrientes em geral (BATISTA et al., 2004; GOMES, 2006).

A indústria deve então escolher o método de armazenamento que se adequará a venda do produto, e dentre as tecnologias utilizadas para a preservação do pescado, o congelamento que é um método amplamente empregado pela indústria, pois permite conservar o músculo pela redução da temperatura abaixo do ponto de congelamento, reduzindo a degradação química e inibindo a proliferação microbiana (SÁ, 2004; CAI et al., 2014).

O presente estudo teve por objetivo avaliar, através dos parâmetros indicadores de qualidade da carne, os efeitos de diferentes períodos de jejum (0, 24 e 48 horas) combinados a métodos de insensibilização pré-abate (hipotermia e eletronarcose) aplicados em tilápia do Nilo, estocadas por até 120 dias e mantidas congeladas a -18°C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), sob o protocolo CEUA no. 7758310817.

2.1 Animais e procedimento experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), em Pirassununga - SP. As 54 tilápias (com peso médio de $570,55 \pm 20,76$ g e comprimento de $31,69 \pm 1,88$ cm) foram adquiridas em uma piscicultura comercial e aclimatadas em três tanques de concreto (contendo cada tanque 18 tilápias) por dez dias antes do início dos experimentos para evitar que o estresse causado pelo transporte pudesse interferir nos resultados dos experimentos.

Após a aclimação, cada lote de peixes foi submetido aos diferentes períodos de jejum (0, 24, 48 h) e posteriormente seis animais de cada lote foram submetidos a dois métodos de insensibilização sendo: (1) hipotermia - exposição dos animais em uma caixa a solução de água e gelo na proporção 1:1 e (2) eletronarcose - exposição dos animais em uma caixa com corrente elétrica de 220 volts, 1500 Hz, 3,5 amperes por 15s. A insensibilização foi confirmada pela ausência de reflexos ao estímulo da linha lateral, observação da natação, do equilíbrio, ausência de comportamento de fuga, movimentação

do opérculo e pela ausência reflexo vestibulo-ocular, segundo o protocolo proposto por Kestin, Van des Vis e Robb (2002).

Foi realizado a aferição dos parâmetros da qualidade de água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade) com o auxílio da sonda multi-parâmetro Horiba (modelo U-10), antes e após a insensibilização das tilápias expostas aos tratamentos. Posteriormente, as tilápias foram abatidas através do corte das brânquias e realizada a sangria em água gelada. Todos os peixes foram medidos com o auxílio de um ictiômetro, pesados em balança digital, filetados e os filés congelados em congelador de placas a -40°C . Cada filé foi embalado em um saco plástico, identificado, e estocado a -18°C até 120 dias.

2.2 Procedimentos pós-abate

As amostragens foram realizadas logo após a determinação da morte dos peixes (hora 0) e aos 30, 60, 90 e 120 dias de armazenagem, estocadas em congelador a -18°C . A amostragem foi realizada em 12 peixes de cada tratamento, sendo que em cada lote havia seis peixes insensibilizados por hipotermia e outros seis peixes insensibilizados por eletronarcose.

O pH dos filés foi determinado em triplicata utilizando-se três filés de cada tratamento, triturado e homogeneizadas em um processador de alimentos (Walita Master), com o emprego de um peagâmetro com eletrodo de imersão (VDSF, Umwelttechnik) em uma mistura de 10 g de amostra com 40 ml de água destilada.

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

A concentração de bases nitrogenadas voláteis (BNV) foi determinada em triplicata utilizando-se três filés de cada tratamento, de acordo com a metodologia de Howgate (1976). Os mesmos filés serviram para a análise de oxidação lipídica sendo

determinada pela metodologia proposta por Vyncke (1970). Foram retirados 5g de amostra, triturada em processador de alimentos e misturados em 25 mL TCA (7,5%). A solução foi filtrada em papel filtro (Whatman nº1) e foram retirados 4 mL do filtrado e misturados a 1mL de TCA (7,5%) e a 5mL de TBA (0,02M), e essa solução foi fervida em banho maria a 100°C durante 40 minutos. Posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro (600 Femto) com comprimento de onda de 538nm. Para o cálculo dos valores de TBARS obteve-se uma reta da curva padrão ($y=104,96x+0,024$) com tetrametoxipropano, e os resultados foram expressos em mg malonaldeído / kg amostra.

As perdas de água por descongelamento (*drip loss*) foram determinadas segundo Santo, Coste e Reguly (1980) em três filés de cada tratamento. Os filés congelados foram pesados e colocados em funis de vidro cobertos por filme de PVC, durante 48h em ambiente controlado (estufa BOD TE 390, Tecnal) a 4°C. As perdas de água por descongelamento foram expressas em porcentagem de água perdida em relação ao peso original da amostra.

A capacidade de retenção de água foi realizada conforme descrito por Goes et al. (2015), modificado. Três filés de tilápias foram descongelados (colocados em estufa - BOD TE 390, Tecnal - a 4°C durante 24 horas) e em seguida retirou-se 5g de cada amostra, sendo trituradas e homogeneizadas, e envolvidas entre dois papéis de filtro circular de 5,5 cm de diâmetro, espessura de 200 µm e gramatura de 80 g/m². O cartucho com a amostra foi submetido à centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos em centrífuga Eppendorf (Centrifuge 5810R). Posteriormente a amostra e os papéis foram pesados e os resultados expressos em porcentagem.

2.3 Análise estatística

Para análises dos resultados foi montado um esquema fatorial sendo três períodos de jejuns x duas insensibilizações e cinco pontos amostrais (0, 30, 60, 90 e 120 dias). Para atender as pressuposições de análise, a normalidade foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk e D'Agostino-Pearson, e homocedasticidade das variâncias pelo teste de Cochran. Foi realizada análise de Variância (ANOVA) fatorial dois efeitos, ou seja, tratamento x tempo, com $p<0,05$, e nos casos em que houveram diferenças significativas foi aplicado

o teste de Tukey, a um nível de significância de 5%. Utilizou-se o software SAS 9.2 (SAS INSTITUTE, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade de água dos tanques manteve-se estável durante a aclimação (pH: 6,56, [O₂]: 8,7 mg.L⁻¹, temperatura 25,3°C) e durante o experimento os valores de pH e oxigênio dissolvido (OD) mantiveram-se estáveis durante toda a aplicação da corrente elétrica e dentro do esperado para a água utilizada nos tratamentos. A salinidade observada no tratamento de eletronarcose (0,02%) ocorreu devido a diluição de NaCl na água onde os peixes foram imersos para a aplicação da corrente com o intuito de melhorar a condutividade elétrica, aumentando assim a eficácia do tratamento. Os resultados podem ser vistos na Tabela 8. Durante o experimento observou-se que houve uma maior demora na insensibilização aparente nos jejum 48h (hipotermia) (17 minutos).

Tabela 8 – Tempo de insensibilização e parâmetros de qualidade da água (oxigênio dissolvido - OD, temperatura, condutividade elétrica, pH e salinidade da água) das caixas onde foram aplicadas as insensibilizações com hipotermia e eletronarcose das tilápias submetidas a jejuns diferentes.

Jejuns	Insensibilização	Tempo de insensibilização	OD (mg/L)	Temperatura (°C)	Condutividade (µ/cm)	pH	Salinidade (%)
			Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização	Antes / Após insensibilização
Jejum 0h	Hipotermia	15 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,219/0,206	6,15/6,08	0/0
	Eletronarcose	15s	8,23/8,24	24,1/24,5	0,589/0,578	7,04/7,00	0,02/0,02
Jejum 24h	Hipotermia	15 min	19,99/19,99	1,2/1,2	0,222/0,198	6,56/6,44	0/0
	Eletronarcose	15s	8,39/8,39	24,3/24,5	0,632/0,630	6,82/6,82	0,02/0,02
Jejum 48h	Hipotermia	17 min	19,99/19,99	1,2/1,4	0,215/0,227	6,47/6,44	0/0
	Eletronarcose	15s	8,24/8,25	24,1/24,7	0,572/0,569	7,03/7,03	0,02/0,02

Na Figura 19 estão apresentadas as medidas de pH muscular nos filés dos peixes, estocados sob congelamento durante 120 dias. Os tratamentos tiveram efeito significativos ($p < 0,05$) onde houve maior diferença no tratamento jejum 48h/eletronarcose (6,61 a 6,22) e houve diferença na relação tratamento x tempo, mais

acentuada nos 60° e 90° dias de armazenamento, com exceção do tratamento sem jejum/eletroanestesia.

Figura 19 – Dados de pH em tilápias (*Oreochromis niloticus*) inteiras e congeladas submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletroanestesia. Letras diferentes ao lado dos tratamentos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Santos (2013) pesquisando em filés de tilápias congeladas insensibilizadas por choque térmico encontrou valor de pH superior a 7,0 no 60° dia. Neste estudo, o valor de pH que mais se aproximaram a 7,0 foi visualizado no 30° dia nos grupos sem jejum/hipotermia e sem jejum/eletroanestesia, não comprometendo desta forma a possível comercialização desses filés na categoria fresco.

Segundo a Instrução normativa nº 21, de 31 de maio de 2017 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA, 2017), para peixe congelado o pH da porção muscular deve ser no máximo de 7,00 (sete inteiros), excluídas as espécies das famílias Gadidae e Merlucciidae cujo valor deve ser no máximo de 7,20 (sete inteiros e vinte décimos). Portanto, as amostras deste estudo poderiam ser comercializadas ao final dos 120 dias de estocagem, sob congelamento de -18°C , cumprindo normas legislativas.

Na intensidade da cor representada por a^* (verde-vermelho) e b^* (azul-amarelo) e na luminosidade representada por L^* (preto-branco) houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Os padrões de luminosidade para os tratamentos submetidos à eletroanestesia mantiveram-se inferiores (coloração mais escura) em L^* e observou-se que a partir do 90° dia houve uma queda em todos os escores de L^* ,

evidenciando um efeito negativo do tempo de armazenamento congelado a -18°C . Os dados podem ser vistos na Figura 20.

Figura 20 – Cor instrumental avaliada nos filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronnarcose. Letras diferentes ao lado dos tratamentos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Durante o processo de filetagem, verificou-se uma tendência à coloração vermelha dos filés insensibilizados por eletronnarcose, observação confirmada pelos escores na intensidade da cor a^* nas fases iniciais, os quais se mantiveram acima dos valores dos demais tratamentos e isso pode ter ocorrido devido aos pontos hemorrágicos encontrados nos filés. Para outras espécies de peixes também tem sido relatado que a aplicação de corrente elétrica resultou em uma cor mais escura, sendo observado anteriormente no bagre (BOGGESS; HEATON; SHEWFELT et al., 1973) e enguias (MORZEL; SOHIER; VAN DE VIS, 2003). A variável b^* apresentou um declive ao final do período de armazenamento e o tratamento com índice de menor valor foi jejum 48h/elettronnarcose.

Lambooij et al. (2008) afirmam que para robalos (*Dicentrarchus labrax*) as variações nos padrões de cor (L^* , a^* , b^*) são significativamente dependentes do método de atordoamento e do tempo de armazenamento. Neste estudo, os padrões de cor L^* , a^*

e b* também aparentaram terem sido afetados pelo método de insensibilização, independente do jejum.

As bases nitrogenadas voláteis foram aferidas em filés congelados de tilápia do Nilo e não foram constatadas diferenças ($p>0,05$). Observou-se que os valores de BNV aumentaram até o final do dia de estocagem (Fig. 21), exceto o tratamento jejum 24h/hipotermia, que apresentou oscilações do 30º ao 60º dia e do 90º ao 120º dia de estocagem. Os tratamentos não alcançaram o limite de 30 mg de BNV/100 g estabelecido pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) para congelado. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos, embora tenham ocorrido diferenças na interação tratamento x tempo de estocagem para a análise de BNV ao longo dos meses. Os maiores valores foram alcançados aos 120 dias de congelamento, na sequência decrescente: ausência de jejum/hipotermia (16,78), ausência de jejum/elettronarcose (15,96), jejum 24h/elettronarcose (15,34), jejum 48h/elettronarcose (14,71), jejum 48h/hipotermia (14,21), jejum 24h/hipotermia (14,01 mg/100g).

Figura 21 – Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronnarcose.

De acordo com Huss, Ababouch e Gram (2003) quando o conteúdo de BNV aumenta rapidamente no músculo, o pescado começa a apresentar sinais de perda de qualidade. Também se ressalta que os valores de BNV podem variar de acordo com a metodologia empregada no pré-abate, a espécie estudada e o estágio de alteração. O pescado de água doce, por exemplo, sofre menos alterações que o pescado marinho no seu conteúdo de bases voláteis ao longo do tempo de armazenamento (KUAYE, 1982).

Por isso não deve ser a única técnica empregada para avaliação da qualidade do filé de pescado.

Estresse oxidativo é a condição na qual a produção celular de radicais livres e espécies reativas de oxigênio excede a capacidade fisiológica do sistema de defesa antioxidante em remover esses compostos (BLOOMER et al., 2005). Nos últimos anos, estudos têm mostrado a ação de fatores anaeróbios em diversas situações e modalidades que promovem a formação de espécies reativas de oxigênio e aumentam o estresse oxidativo (BLOOMER, 2007). Esse processo gera dano na fibra muscular, como também promove a peroxidação lipídica, iniciação de processos inflamatórios e oxidação de proteínas, mecanismos esses que podem afetar proteínas estruturais e contráteis e contribuir para aceleração do rigor. Neste trabalho, os valores de TBARS aumentaram ao longo do tempo de armazenamento e os maiores valores (em ordem decrescente) ao final do experimento foram obtidos nos tratamentos com jejum de 48h ($0,41 \pm 0,05$) e 24h ($0,39 \pm 0,05$) ambos insensibilizados por eletronarcose; e jejum de 48h ($0,38 \pm 0,02$) e 24h ($0,36 \pm 0,02$) ambos insensibilizados por hipotermia. Houve diferenças significativas entre os tratamentos com o jejum ($p < 0,05$) (Fig. 22), mostrando desta forma que o estresse alimentar afeta significativamente o aumento do estresse oxidativo - peroxidação lipídica. Além disso, associado a uma insensibilização por eletronarcose pode afetar de modo negativo a qualidade final do produto.

Figura 22 – TBARS em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose. Letras diferentes ao lado dos tratamentos significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Os resultados das análises de TBARS corroboram com a afirmação de Sant'ana, Mancini-Filho (2000) e Neiva (2003) de que somente a redução da temperatura não impede o processo de desenvolvimento da oxidação lipídica, que ocorre mesmo durante a estocagem de alimentos congelados, pois o armazenamento congelado não paralisa as reações oxidativas. Ainda mais se forem oriundas de fatores anteriores ao abate, podendo o estresse agudo ou crônico sofrido durante o pré-abate interferir na taxa de TBARS.

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

O *drip loss* é interpretado como um resultado de algum processo aplicado à carne que gera dano celular, portanto é uma análise válida para compreender o quanto os exsudatos resultantes do congelamento e descongelamento estão ocorrendo ao longo do processo de armazenamento (BRESSAN et al., 2001). A quantidade de água do tecido muscular é de grande importância em vários aspectos, principalmente no que se refere à questão econômica e nutricional do pescado, já que com a perda de água o valor nutritivo do músculo diminuiu devido às perdas de proteínas hidrossolúveis e minerais pelo descongelamento (SUTTON, 1969). Neste trabalho não se observou diferença significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$) para *drip loss* (Fig. 23), porém foi observado que houve diferenças significativas ao longo do tempo de estocagem dos filés e na interação tratamento x tempo ($p < 0,05$), apresentando valores médios mais elevados a partir 60º dia de estocagem.

Figura 23 – Percentual de perda de água por descongelamento (*drip loss*) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.

Filés de salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) armazenados a 0°C por 22 dias tiveram aumento nas perdas de água com o passar do tempo de estocagem, atingindo valor médio de 2,9% de perdas ao término do experimento (FLETCHER et al., 2003). Neste trabalho não foi constatada interferência do jejum ou da insensibilização, no *drip loss*, mas ao longo do tempo armazenamento houve aumento em todos os tratamentos na perda por exsudação. De acordo com Rosenvold et al. (2008), as perdas de água que ocorrem na carne estão relacionadas com as proteínas do citoesqueleto, ou ocorrem devido à degradação das proteínas, ao longo do tempo de estocagem.

Neste estudo observou-se que a CRA de água foi afetada a partir do 60º dia, quando ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) para os tempos de estocagem dos filés e na interação tratamento x tempo (Fig. 24).

Figura 24 – Percentual capacidade de retenção de água (CRA) em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes jejuns (J0- ausência de jejum, J24- jejum de 24 horas e J48- jejum de 48 horas) e insensibilizadas por hipotermia e eletronarcose.

A CRA está diretamente relacionada à maciez dos produtos processados e a diminuição de tamanho e suculência quando há perdas de água no armazenamento e cozimento do produto (CASTRO, 2007). As perdas de água, sejam pela exsudação durante o congelamento, pela pressão sob os tecidos durante a estocagem ou pela desnaturação das proteínas durante o cozimento, acabam conferindo ao produto características sensoriais indesejadas, como diminuição da suculência e perda de peso (LAKSHMANAN; PARKINSON; PIGGOTT, 2007).

A CRA é diretamente influenciada pelo pH do músculo. Segundo Carneiro et al. (2013), com o aumento do pH no músculo as proteínas se afastam do seu ponto isoelétrico, resultando em aumento da carga líquida negativa e, consequentemente,

aumento da repulsão eletrostática entre elas, que favorece a retenção de água no produto. Este comportamento foi observado no presente trabalho, em que as amostras tiveram diminuição do pH (notório a partir do 90º dia de armazenamento), também demonstraram menor CRA.

4. CONCLUSÃO

A aplicação do jejum e da insensibilização por eletronarcose contribui na deterioração dos filés de tilápia do Nilo, onde se observa uma coloração mais avermelhada, tornando este produto indesejável ao consumidor. Porém, a escolha desse método de insensibilização não impede que até 120 dias de armazenamento, à -18°C, os produtos possam ser comercializados dentro dos padrões aceitáveis segundo a legislação brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KAHTANI, H.A.; ABU-TARBOUSH, H.M.; BAJABER, A.S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in tilapia and Spanish mackerel. **Journal of Food Science**, v.61, n.4, p.729-733, 1996.
- BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, 42(3), 517–525. 2002.
- BATISTA, G.M.; LESSI, E.; KODAIRA, M.; FALCÃO, P.T. Postmortem biochemical changes in matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) coming from the fish, kept in ice. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24 (4): 573-581. 2004.
- BERMEJO-POZA, R. et al. The effect of intermittent feeding on the pre-slaughter fasting response in rainbow trout. **Aquaculture**, v. 443, p. 24-30, 2015.
- BLOOMER, R.J. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. **Sports Med**, v.37(6):519-32. 2007.
- BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H.; WIDEMAN, L.; MCKENZIE, M.J.; CONSITT, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. **J Strength Cond Res**;19 (2):276-85. 2005.

BOGGESS Jr., T.S., HEATON, E.K., SHEWFELT, A.L., PARVIN, D.W., Techniques for stunning channel catfish and their effects on product quality. **Journal of Food Science**, v.38, p. 1190–1193, 1973.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), pescados e derivados 2000. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda>>. Acesso em 10 de dezembro de 2017.

BRESSAN, M.C. et al. Efeito do peso ao abate de cordeiros santa inês e bergamácia sobre as características físico-químicas da carne. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 293-303, Dec. 2001.

CAI, L.; WU, X.; LI, X.; ZHONG, K.; LI, Y.; LI, J. Effects of different freezing treatments on physicochemical responses and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) fillets during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.59, n.1, p.122–129, 2014.

CAMPUS, M; ADDIS, M.F.; CAPPUCCINELLI, R.; PORCU, M.C.; PRETTI, L.; TEDDE, V.; SECCHI, N.; STARA, G.; ROGGIO, T. Stress relaxation behavior and structural changes of muscle tissues from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following high-pressure treatment. **Journal Food Engineering**, v.96, n.2, p.192–8, 2010.

CARNEIRO, S.C.; MARSICO, E.T.; RIBEIRO, R.O.R.; CONTE JÚNIOR, C.A.; ALVARES, T.S.; JESUS, E.F.O. Studies of the effect of sodium tripolyphosphate on frozen shrimp by physicochemical analytical methods and Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF 1H NMR). **LWT - Food Science and Technology**, v.50, p. 401-407, 2013.

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

EFSA - European Food Safety Association. **Species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed carp**. EFSA Journal, 7(4). 2009.

EINEN, O.; GUERIN, T.; FJAERA, S.O.; SKJERVOLD, P.O. Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 212, p.129–140, 2002.

FLETCHER, G.C.; CORRIGAN, V.K.; SUMMERS, G.; LEONARD, M.G.; JERRETT, A.R.; BLACK, S.E. Spoilage of Rested Harvested King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Food Science**, v.68, n.9, p. 2810-2816, 2003.

GOES, E.S. et al. Pre-slaughter stress affects ryanodine receptor protein gene expression and the water-holding capacity in fillets of the Nile tilapia. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129145, 2015.

GOMES, L.M. **Influência das condições de manuseio e conservação na qualidade do pescado.** Trabalho de conclusão de curso. Instituto Qualittas de pós-graduação em Medicina Veterinária. São Paulo, p.43. 2006.

HOWGATE, P. **Determination of total volatile bases.** Torry Research Station. Aberdeen: Appendix 4 TD564, 1976.

HUSS, H.H.; ABABOUC, L.; GRAM, L. Assessment and management of seafood safety and quality. **Fisheries Technical Papers**, n. 444, p.203. 230, 2003.

KESTIN, S. C.; VAN DE VIS, J. W.; ROBB, D. H. Protocol for assessing brain function in fish and the effectiveness of methods used to stun and kill them. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 9, p. 113-118, 2002.

KUAYE, A.Y. **Comparação dos métodos para determinação das bases nitrogenadas em pescado: parâmetros críticos e modificações.** 1982. 95f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1982.

KUBITZA, F.O. Cultivo de tilápia no Brasil: origens e cenário atual status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.21, p.1019, 2011.

LAKSHMANAN, R.; PARKINSON, J. A.; PIGGOTT, J. R. High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). **Lebensmittel- Wissenschaft und- Technologie**, v. 40, p. 544 -551, 2007.

LAMBOOIJ, B.; GERRITZEN, M.A.; REIMERT, H.; BURGGRAAF, D.; ANDRÉ, G.; VAN DE VIS, H. Evaluation of electrical stunning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in seawater and killing by chilling: welfare aspects, product quality and possibilities for implementation. **Aquaculture Research**, 39, 50–58. 2008.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 21, de 31 de Maio de 2017.** Regulamento Técnico que fixa a identidade e as características de qualidade que deve apresentar o peixe congelado. DOU, Brasília, DF, 7 jun. 2017.

MORZEL, M., SOHIER, D., VAN DE VIS, H. Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v.83, p.19–28, 2003.

NEIVA, C. R. P. **Obtenção e caracterização de minced fish de sardinha e sua estabilidade durante a estocagem sob congelamento.** Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 78p. 2003.

OEHLENSCHLÄGER J.; SÖRENSEN, N.K. Criteria of fish freshness and quality aspects. In: THE FINAL MEETING OF THE CONCERTED ACTION - EVALUATION OF FISH FRESHNESS - 1997, Nantes. **Anais...** Nantes, p.30-35. 1997.

RASCO, B.; DOWN, K.; OVISSIPOUR, M. Humane harvesting initiative: The influence of harvest and post-harvest handling practices on fish welfare and product quality. **Journal of Aquaculture Research and Development**, 6(2), 303. 2015.

ROBB, D.H.F. Welfare of fish at harvest. In: Branson, E.J. (Ed.), **Fish Welfare**. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 217–242. 2008.

ROSENVOLD, K.; NORTH, M.; DEVINE, C. E.; MICKLANDER, E.; HANSEN, P. W.; DOBBIE, P. M. The protective effect of electrical stimulation and wrapping on beef tenderness at high pre rigor temperatures. **Meat Science**, v.79, n.2, p.299–306, 2008.

SÁ, E. Conservação do pescado. **Revista Aquicultura & Pesca**, Ano I, n.1, p.20- 26. 2004.

SANT'ANA, L.S.; MANCINI-FILHO, J. Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets. **Food Chemistry**, v.68, p.175-178, 2000.

SANTO, R.M.; COSTA, R.N.; REGULY, C.J. Preparo de alimentos prontos e quase prontos à base de pescado, para consumo institucional. **Rio Grande do Sul: Fundação Universidade Rio Grande**. 59p, 1980.

SANTOS, E. C. B. **Métodos de abate e qualidade da tilápia do nilo**. 100f. 2013. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Aquicultura)-Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2013.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: user's Guide**. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869p.

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 67, n. 2-3, p. 117-124, 2005.

SUTTON, A.H. **Polyphosphate treatment of Cod muscle**. In Freezing and Irradiation, (R. Kreuzer, ed.), 1969.

TULLI, F.; FABBRO, A.; D'AGARO, E.; MESSINA, M.; BONGIORNO, T.; VENIR, E., et al. The effect of slaughtering methods on actin degradation and on muscle quality attributes of farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, 52(11), 7182–7190. 2015.

VYNCKE, B.W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.72, n.12, p.1084-1087, 1970.

ZHANG, L. et al. The impact of stunning methods on stress conditions and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at 4°C during 72 h postmortem. **Food chemistry**, v. 216, p. 130-137, 2017.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, o jejum a longo prazo provou ser um fator crítico no pré-abate dos animais e associado a uma insensibilização demorada ou agressiva causa na tilápia um efeito estressor que compromete a biologia do animal e até mesmo o comportamento. Foi visto que o jejum de 72h estimulou maior movimentação dos animais no tanque, além de brigas causando lesões na pele e nas nadadeiras. Recomenda-se então, de acordo com os resultados deste estudo, que para o transporte dos peixes vivos seja aplicado o jejum de 24 a 48 horas antes do manejo.

A insensibilização por choque elétrico é considerada segundo protocolos internacionais uma das melhores metodologias para insensibilização de peixes seguindo preceitos de bem-estar animal, no entanto, dependendo dos parâmetros aplicados durante a eletronarcose, se estes não forem adequados, podem causar rompimentos vasculares, comprometendo não apenas o aspecto visual, mas sendo uma fonte de proliferação de agentes microbianos causando desta forma uma rápida perecibilidade do produto final.

Para os aspectos referentes ao bem-estar animal a eletronarcose, quando aplicada dentro de uma determinada voltagem e tempo, apresenta-se como uma metodologia de insensibilização eficiente no pré-abate da tilápia, uma vez que provoca rápida insensibilização, sem promover sofrimento demasiado e desnecessário ao animal, atendendo os preceitos básicos de abate humanitário.

O não cumprimento de um protocolo adequado pode ocasionar queda na qualidade do produto final a ser comercializado, portanto, são necessários mais estudos, não só com a tilápia, mas também com espécies nativas, objetivando definir um protocolo que atenda a preceitos humanitários para peixes de cultivo e que garanta um produto final de alta qualidade.