



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos**

**EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA RECEPTORA DA RIANODINA E  
QUALIDADE DA CARNE EM TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA AO ESTRESSE  
ANTES DO ABATE**

**ELENICE SOUZA DOS REIS GOES**

**Maringá**

**2015**

**ELENICE SOUZA DOS REIS GOES**

**EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA RECEPTORA DA RIANODINA E  
QUALIDADE DA CARNE EM TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA AO ESTRESSE  
ANTES DO ABATE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciência de Alimentos.

**Maringá**

**2015**

**Orientador**

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

G598e Goes, Elenice Souza dos Reis  
Expressão gênica da proteína receptora da rianodina e qualidade da carne em tilápia-do-Nilo submetida ao estresse antes do abate / Elenice Souza dos Reis Goes. -- Maringá, 2015.  
13, 26, 22 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, 2015.

1. Tilápia-do-Nilo - Estresse. 2. Tilápia-do-Nilo - Capacidade de retenção de água. 3. Tilápia-do-Nilo - Qualidade da Carne. 4. Rianodina - Receptores. 5. Expressão gênica - Peixes. 6. Tilápia-do-Nilo - Variedade TILAMAX. 7. Tilápia-do-Nilo - Aquicultura. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos. III. Título.

CDD 21.ed. 639.3774

AMMA-002994

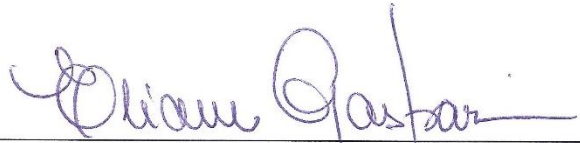
**ELENICE DE SOUZA DOS REIS GOES**

**“EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEINA RECEPTORA DA RIANODINA E  
QUALIDADE DA CARNE EM TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA AO  
ESTRESSE ANTES DOS ABATE”**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.




**Prof. Dr. Lauro Daniel Vargas Mendes**



**Profa. Dra. Eliane Gasparino**



**Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado**



**Prof. Dr. Jorge Antonio Ferreira de Lara**



**Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro**  
Orientador

## BIOGRAFIA

Elenice Souza dos Reis Goes nasceu em 01 de março de 1988, na cidade de Toledo (PR), filha de Nilce Ramos de Souza dos Reis e Valdomiro Marques dos Reis. Ingressou nos cursos de Engenharia de Pesca e Administração em março de 2006.

Obteve o título de Administradora em dezembro de 2009 pela Faculdade Sul Brasil, com a defesa do trabalho intitulado “Plano de negócios: implantação da empresa Fish Life - beneficiamento de pescado”.

Em dezembro de 2010 obteve o título de Engenheira de Pesca pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, com a monografia “Elaboração de biscoitos tipo cookies com inclusão de peixe”.

Iniciou o Mestrado em Zootecnia em março de 2010, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Após defender a dissertação intitulada “Suplementação de selênio e vitamina E em dietas para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*)”, em fevereiro de 2012 obteve o título de Mestre em Zootecnia.

Em março de 2012 deu início ao doutorado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá, desenvolvendo estudos na área de variabilidade genética de peixes, expressão gênica, qualidade da carne de peixes e tecnologia do pescado. Em junho de 2015 obteve o título de Doutora em Ciência de Alimentos.

*Dedico este trabalho à minha mãe Nilce.*

*As lembranças do seu amor, força e persistência  
me inspiram diariamente.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, que por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, possibilitou a obtenção deste título.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Pantanal), agradeço pela estrutura disponibilizada para análises de qualidade da carne.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, possibilitando assim a minha dedicação exclusiva aos estudos e pesquisa científica.

Agradeço ao meu orientador professor Ricardo Pereira Ribeiro, por me apresentar a uma nova área e me dar possibilidades irrestritas de crescer nela. Muito obrigada, professor, por todo o incentivo e pela valiosa contribuição em minha formação científica.

Muito obrigada à professora Eliane Gasparino, que com carinho me acolheu como sua orientada e dedicadamente me auxiliou no delineamento, análises de expressão gênica e estatística do trabalho.

Obrigada ao Dr. Jorge Antônio Ferreira de Lara, por sugerir pela primeira vez que a rianodina poderia ser influenciada pelo estresse e afetar a qualidade da carne em peixes, me guiando assim na escolha do tema desta tese. Agradeço também pela orientação nas análises de qualidade da carne, pelos conselhos e apoio durante a busca pela publicação destes dados.

Obrigada ao professor Carlos Antônio Lopes de Oliveira, pela ajuda na estatística da análise sensorial.

Aos membros da banca examinadora da tese, agradeço pelas valiosas sugestões.

Muitas pessoas me ajudaram durante o experimento a campo. Estas boas almas do grupo PeixeGen suportaram o calor e trabalharam ferozmente para fazer acontecer o experimento, por isso merecem minha eterna gratidão. São elas: Aline Mayra da Silva Oliveira Zardin, Dilma Figueiredo Botter, Fernanda Tanamati, Gabriel Soriani Rizzato, Graciella Lucca Braccini, Grazyella Yoshida, Herena Chisali, Marcia Matos de Abreu, Maria del Pilar Rodriguez Rodriguez, Pedro Luiz de Castro, Vitor Moisés, Armando e Cristina. Em especial, agradeço às amigas Pilar, Marcia e Graciela, pela amizade e por fazerem os meus dias no laboratório serem bem mais agradáveis.



Agradeço também ao Luiz Alexandre Filho, que coordenou a engorda dos peixes e habilmente resolveu cada problema durante o experimento de transporte. Agradeço aos funcionários do Rio do Corvo Pedro e Mário, e aos funcionários da Codapar, Vitor, Cleiton e Geraldo, pelo apoio irrestrito.

Um obrigado especial à Ana Paula Del Vesco, que com muito entusiasmo me ensinou as práticas de expressão gênica, agradeço por sua amizade e pelos momentos de descontração. Obrigada também à Angélica Souza Khatlab e Stefania Caroline Claudino da Silva, que me ajudaram durante o processamento das amostras para expressão.

Na EMBRAPA Pantanal, foram especiais para a realização de todas as análises: Jovana Silva Garbelini Zuanazi, Emerson Esnarriaga, Jonathan Coimbra Carvalho e Tabata Cristina da Silva. Da EMBRAPA, agradeço também aos noventa provadores que graciosamente aceitaram colaborar nas análises sensoriais; aproveitando para agradecer de novo à Jovana, que nos guiou para encontrar todas essas pessoas.

À professora Maria Luiza Rodrigues de Souza, agradeço por me possibilitar trabalhar com desenvolvimento de produtos à base de peixe, durante o doutorado. Obrigada pelo carinho e por me aceitar de forma tão aberta em seus trabalhos.

Por tudo, agradeço aos meus pais, Nilce (em lembrança) e Valdomiro. Pai, obrigada por se orgulhar de mim, e mãe, essa conquista é sua! Aos meus irmãos (Eliandro e Eliézer) e irmãs (Elisandra e Eliane) pelo apoio incondicional. Em especial, ofereço todo meu carinho para minha irmã Eliane, pelas conversas de horas ao telefone, por me incentivar, consolar e se alegrar comigo.

Por existirem em minha vida, agradeço às amigas Micheli Zaminhan, Denise Aparecida Zempulski e Joana Karin Finkler.

Finalmente, agradeço ao Marcio Douglas Goes. Não só meu esposo, mas também meu confidente e minha tábua de salvação. Obrigada por manter a fé na minha capacidade, por me acompanhar em tudo, me ajudar em todas as análises, escutar meus lamentos e oferecer ideias brilhantes para cada problema no decorrer do experimento, e durante todos os nossos anos juntos. Não estou brincando ao dizer que este doutorado não teria sido possível sem ele.

E acima de tudo, eu agradeço a Deus, por tantas coisas boas que Ele faz em minha vida, todos os dias...

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada na forma de dois artigos científicos:

1. Elenice Souza dos Reis Goes, Jorge Antônio Ferreira de Lara, Eliane Gasparino, Ana Paula Del Vesco, Marcio Douglas Goes, Luiz Alexandre Filho, Ricardo Pereira Ribeiro. **Pre-slaughter stress affects ryanodine receptor protein gene expression and the water-holding capacity in fillets of the Nile tilapia.** *PLOS ONE*, v. 10, p. e0129145, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0129145
2. Elenice Souza dos Reis Goes, Jorge Antônio Ferreira de Lara, Eliane Gasparino, Marcio Douglas Goes, Jovana Silva Garbelini Zuanazzi, Nelson Maurício Lopera-Barrero, Maria del Pilar Rodriguez Rodriguez, Pedro Luiz de Castro, Ricardo Pereira Ribeiro. **Qualidade e análise sensorial de filés de tilápia-do-Nilo submetida ao estresse pelo transporte em diferentes densidades de estocagem e tempos.** *Normas do periódico Journal of Aquatic Food Product Technology.*

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Fish management procedures in aquiculture, such as capture, handling and transport, are often traumatic and cause serious physiological and biochemical reactions. The importance of the reduction of pre-slaughter stress is due to the fact that vigorous swimming intensely employs the white muscle, increases the anaerobic glycolysis and the production of lactic acid, and decreases muscle's pH with the structural degradation of muscular proteins. The above diminishes the meat's water-holding capacity (WHC). The genetic factors bonded to changes in the muscle's WHC are related to alterations in the activity of ryanodine receptors which may decrease the ability of this channel to control the release of calcium to the cytoplasm of the muscular cell, especially in periods of physical stress. Calcium excess in the cytosol causes fast muscular contraction, with an acceleration of anaerobic metabolism and *post-mortem* glycolysis. The muscle's pH is drastically decreased, affecting the muscle's capacity to retain water in the intracellular stores. Changes in muscle quality derived from pre-slaughter stress diminish shelf life and bring economic liabilities for the fish industry.

**AIMS:** Current analysis assesses the pre-slaughter stress caused by transport and its influence on stress indicators, fillets' quality and sensorial factors, and genetic expression of the ryanodine receptor protein (RyR) in Nile tilapias.

**MATERIALS AND METHODS:** The establishment of pre-slaughter management situations characterizing acute stress *ante-mortem* levels in the tilapias was conducted by an assay with different densities and periods of transport. The assay had a 3 x 4 factorial design, with three densities (100, 200 and 400 kg live weight/m<sup>3</sup>) at four transport periods (60, 120, 180 and 240 minutes), coupled to a control treatment (fish retrieved from the tank and immediately euthanized), with a total of 13 treatments and 10 replications per treatment (the fish was the experimental unit), with 130 fish (average weight 866.86±143.98 g and total length 33.80±1.63 cm). Levels of serum cortisol and plasma glucose as stress indicators, the gene expression of two isoforms of the ryanodine receptor protein (RyR1 and RyR3), coupled to the following quality parameters of the fillets: pH, colorimetry (luminosity L\* and yellow-blue component b\*), water-holding capacity, loss of water due to pressure and loss of water due to cooking, were analyzed. Different treatments of the factorial design were selected for the sensorial analysis, divided into two experiments. *Sensorial Experiment 1:* fish at average density 200 kg/m<sup>3</sup> at 60 and 240 min (treatments 200 kg/m<sup>3</sup> and 60 min; 200 kg/m<sup>3</sup> and 240 min), and compared to fish of control treatment. *Sensorial Experiment 2:* fish transported during 180 min, at densities 100 and 400 kg/m<sup>3</sup> (treatments 100 kg/m<sup>3</sup> + 180 min; 400 kg/m<sup>3</sup> + 180 min), compared to fish of control treatment. Sensorial analysis was undertaken with 90 non-trained testers, with two tests (acceptance and purchase intention). Tasters had to answer questions on the physical aspect, color, softness, juiciness and taste characteristic of the fish, through a 9-point hedonic scale, between 1 (I disliked it very much) and 9 (I like it very much). The purchase intention

test was undertaken by a 5-point hedonic scale, between 1 (I would not buy it) and 5 (I would surely buy it).

**RESULTS AND DISCUSSION:** There was no effect by density x time interaction on all the parameters evaluated. Transport time alone reduced cortisol levels up to 180 minutes, with increase of WHC and mRNA RyR1 and RyR3 (density 200 kg/m<sup>3</sup>). Isoforms RyR1 and RyR3 affected differently the water-holding capacity in the tilapia. Defect in calcium regulation mainly occurred in the gene that codified the RyR1. The pre-slaughter stress reduced the RyR1 gene expression and the decrease of pre-slaughter stress raised the fillets' water-holding capacity. When treatments in the sensorial analysis only are assessed (Sensorials Experiments 1 and 2), the 60-min period in *Sensorial Experiment 1* caused a higher concentration of serum cortisol (27.8 µg/dL) and plasma glucose (167.2 mg/dL) when compared to that at 240 min and to control. Stress caused WHC and a greater water loss by pressure at 60-min period when compared to fish transported during 240 min. The fillets had a higher score for juiciness. Moreover, stress did not affect pH, color and water loss by cooking. Transport densities 100 and 400 kg/m<sup>3</sup> in *Sensorial Experiment 2* did not affect stress indexes and instrumental quality parameters of the fillets, even though fish transported at 400 kg/m<sup>3</sup> had a better acceptance by tasters.

**CONCLUSIONS:** Increase in transport time up to 180 min decreased stress expressed by serum cortisol rates. More stressed fish had a lower RyR1 and RyR3 gene expression and a lower water-holding capacity in the meat. Stress reduction caused a linear increase up to 180 min of the parameters. Fish in treatment 200 kg/m<sup>3</sup> and 240 min transport had lower stress rate, higher WHC and lower water loss by pressure, coupled to better juiciness when compared to fish transported at 200 kg/m<sup>3</sup> for 60 min. Results give first evidence that pre-finish stress affects genes that codify ryanodine receptors and, consequently, the fillets' water-holding capacity due to an increase in Ca<sup>2+</sup> availability in cytosol. Following the example of other animal species, future perspectives derived from current analysis will provide the early identification of stress-prone specimens and the development of meat with lower water-holding capacity.

**Keywords:** water-holding capacity; colorimetry; cortisol; hypermetabolism; *Oreochromis niloticus*, pH

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO:** Na aquicultura, os procedimentos de manejo dos peixes, como captura, manuseio e transporte são muitas vezes traumáticos, causando graves reações fisiológicas e bioquímicas. A importância de reduzir o estresse pré-abate se deve ao fato de que a natação vigorosa leva a um uso intenso do músculo branco, aumentando a glicólise anaeróbica e a produção de ácido láctico, diminuindo o pH do músculo e levando à degradação estrutural das proteínas musculares, o que diminui a capacidade de retenção de água (CRA) da carne. Os fatores genéticos ligados a mudanças na CRA do músculo estão relacionados com alterações na atividade dos receptores da rianodina, que podem ocasionar em uma diminuição da capacidade desse canal para controlar a liberação de cálcio para o citoplasma da célula muscular, especialmente sob períodos de estresse físico. O excesso de cálcio no citosol provoca a contração muscular rápida, acelerando o metabolismo anaeróbico e a glicólise *post-mortem*, o que diminui drasticamente o pH muscular, afetando assim a capacidade do músculo reter a água contida nos estoques intracelulares. Alterações na qualidade do músculo advindas do estresse pré-abate diminuem a vida de prateleira e acarretam em prejuízos econômicos para a indústria do pescado.

**OBJETIVOS:** O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse pré-abate provocado pelo transporte e sua influência sobre indicadores de estresse, características de qualidade e sensoriais de filés, e expressão gênica da proteína receptora da rianodina em tilápias-do-Nilo.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Como forma de criar situações de manejo pré-abate onde fosse possível caracterizar níveis de estresse agudo *ante-mortem* nas tilápias, foi realizado um experimento com diferentes densidades e tempos de transporte. O experimento foi conduzido em um esquema fatorial 3x4, sendo três densidades (100, 200 e 400 kg de peso vivo/m<sup>3</sup>) em quatro tempos (60, 120, 180 e 240 minutos) de transporte, com um tratamento controle (peixes retirados do tanque-rede e imediatamente eutanasiados), totalizando assim 13 tratamentos, com 10 repetições por tratamento (sendo o peixe a unidade experimental) num total de 130 peixes (peso médio 866,86±143,98 g e comprimento total 33,80±1,63 cm). Foram analisados os níveis de cortisol sérico e glicose plasmática como indicadores do estresse, a expressão gênica de duas isoformas da proteína receptora da rianodina (RyR1 e RyR3) e os seguintes parâmetros de qualidade dos filés: pH, colorimetria (luminosidade L\* e croma b\*), capacidade de retenção de água, perda de água por pressão e perda de água por cozimento. Para análise sensorial, foram selecionados diferentes tratamentos do esquema fatorial, e divididos em dois experimentos: *Experimento sensorial 1:* foram utilizados peixes da densidade média de 200 kg/m<sup>3</sup> nos tempos 60 e 240 min (tratamentos 200 kg/m<sup>3</sup> e 60 min, 200 kg/m<sup>3</sup> e 240 min), comparando com peixes do tratamento controle, e no *Experimento sensorial 2* foram utilizados peixes transportados por 180 min, nas densidades de 100 e 400 kg/m<sup>3</sup> (tratamentos 100 kg/m<sup>3</sup> + 180 min, 400 kg/m<sup>3</sup> + 180 min), comparando com peixes do tratamento controle. A análise sensorial foi realizada com 90 provadores não-

treinados, sendo aplicados dois testes (aceitação e intenção de compra). Os provadores foram questionados quanto à aparência, cor, maciez, suculência e sabor característico do pescado, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos, ancorada entre 1 (desgostei extremamente) até 9 (gostei extremamente). O teste de intenção de compra foi realizado com escala hedônica de cinco pontos com os extremos 1 (certamente não compraria) e 5 (certamente compraria).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Não houve efeito da interação densidade x tempo sobre todos os parâmetros avaliados. Porém, o tempo de transporte isoladamente acarretou em redução nos níveis de cortisol até 180 minutos, acompanhado do aumento da CRA e da expressão do mRNA RyR1 e RyR3 (na densidade de 200 kg/m<sup>3</sup>). Assim, observou-se que as isoformas RyR1 e RyR3 afetam de forma diferente a CRA em tilápia, sendo que o defeito na regulação de cálcio reside principalmente no gene que codifica a RyR1. O estresse pré-abate acarretou em redução na expressão gênica da RyR1, e a diminuição do estresse pré-abate elevou a CRA dos filés. Filés da densidade 400 kg/m<sup>3</sup> apresentaram maior valor para o componente amarelo-azul (b\*) em relação às demais densidades. Quando avaliados somente os tratamentos utilizados na análise sensorial (Experimentos Sensoriais 1 e 2), no *Experimento Sensorial 1*, o tempo 60 min acarretou em maior concentração de cortisol sérico (27.8 µg/dL) e de glicose plasmática (167,2 mg/dL) em relação ao tempo 240 min e ao controle. Em decorrência deste estresse, foi observada menor CRA e maior perda de água por pressão no tempo 60 min, em comparação com peixes transportados por 240 min, sendo que estes filés apresentaram maior escore para o atributo suculência. pH, cor e perda de água por cozimento não foram afetados pelo estresse. No *Experimento Sensorial 2*, as densidades de transporte 100 e 400 kg/m<sup>3</sup> não afetaram os indicadores de estresse e parâmetros de qualidade instrumental dos filés, porém peixes transportados em 400 kg/m<sup>3</sup> apresentaram melhor aceitação visual pelos provadores, em função dos filés apresentarem cor amarela mais intensa.

**CONCLUSÕES:** O aumento do tempo de transporte até 180 minutos acarretou em uma diminuição do estresse, expresso pelos valores de cortisol sérico. Peixes mais estressados apresentaram menor expressão dos genes RyR1 e RyR3 e menor CRA da carne, sendo que a diminuição do estresse levou ao aumento linear até 180 minutos destes parâmetros. Peixes do tratamento 200 kg/m<sup>3</sup> e 240 min de transporte apresentaram menor estresse, maior CRA e menor perda de água por pressão, além de melhor suculência em relação aos transportados em 200 kg/m<sup>3</sup> por 60 min. Os resultados deste estudo forneceram a primeira evidência de que o estresse pré-abate afeta a expressão dos genes que codificam os receptores da rianodina e por consequência, a capacidade de retenção de água dos filés, ocorrida devido ao aumento da disponibilidade de Ca<sup>2+</sup> no citosol. As perspectivas futuras a partir deste estudo permitem projetar que será possível, a exemplo de outras espécies animais, a identificação precoce de indivíduos mais propensos ao estresse e ao desenvolvimento de carnes com menor capacidade de retenção de água.

**Palavras-chave:** capacidade de retenção de água, colorimetria, cortisol, hipermetabolismo, *Oreochromis niloticus*, pH.

# **Pre-slaughter stress affects ryanodine receptor protein gene expression and the water-holding capacity in fillets of the Nile tilapia**

Elenice S. R. Goes<sup>1¶\*</sup>, Jorge A. F. Lara<sup>2&</sup>, Eliane Gasparino<sup>3&</sup>, Ana P. Del Vesco<sup>3&</sup>,  
Marcio D. Goes<sup>4&</sup>, Luiz Alexandre Filho<sup>3&</sup>, Ricardo P. Ribeiro<sup>3¶</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate degree in Food Science. Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá, Paraná 87020-900, Brazil.

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Pantanal – Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Animal Science, Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá, Paraná, Brazil.

<sup>4</sup>Postgraduate degree in Aquaculture and Sustainable Development. Universidade Federal do Paraná – UFPR – Palotina, Paraná, Brazil.

\* Corresponding author

E-mail: elenicesreis@yahoo.com.br

¶These authors contributed equally to this work.

&These authors also contributed equally to this work.

## Abstract

Current study evaluated the effect of pre-slaughter stress on serum cortisol levels, pH, colorimetry, water-holding capacity (WHC) and gene expression of ryanodine receptors (RyR1 and RyR3) in the Nile tilapia. A 3x4 factorial scheme experiment was conducted comprising three densities (100, 200, 400 kg/m<sup>3</sup>) with four transportation times (60, 120, 180, and 240 minutes). Transportation times alone reduced cortisol levels up to 180 minutes, followed by increased WHC and mRNA expression, RyR1 and RyR3 (200 kg/m<sup>3</sup> density). No effect of density x transportation time interacted on the evaluated parameters. Results provided the first evidence that pre-slaughter stress affected ryanodine gene expression receptors and, consequently, the water-holding capacity in tilapia fillets.

## Introduction

Fish management procedures in aquaculture, such as capture, handling and transportation of fish, are often traumatic, with serious physiological and biochemical reactions. Transporting live fish is a multiple-phase operation that should be managed to minimize stress and costs involved. The transport of fish in tank trucks requires special care to ensure that water quality parameters (especially temperature and oxygen content) and fish density requirements are maintained [1].

Decrease in pre-slaughter stress is important since vigorous swimming causes intense usage of the white muscle, a rise in anaerobic glycolysis and lactic acid production, with a decrease in the muscle's pH [2, 3, 4]. Further, a muscle protein structural degradation occurs which reduces the meat water-holding capacity [5]. Furthermore, since the weight of meat is reduced, the lost exudate contains significant



amounts of protein, mainly sarcoplasmic proteins. Liabilities of millions of dollars occur yearly due to meat with low water retention [6].

Acidification of muscle due to lactic acid level causes animals that struggle at slaughter go into rigor mortis very rapidly [7]. Fish processed during rigor mortis has impaired flesh quality [7] and lower fillet yield [8].

Pre-slaughter stress may be one of the reasons for pale, soft and exudative (PSE) meat development in swine and poultry. The above-mentioned types of meat have a pale color, flaccid texture and a low water-holding capacity, which makes them exudative. Although the mechanisms involved in PSE meat development are not fully understood, it is generally thought that abnormally rapid postmortem skeletal muscle metabolism causes PSE meats [9]. The condition is associated with an excess of calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in the cytosol [10].

Release control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is accomplished through the ryanodine receptors (RyR) which are large homotetrametric protein complexes [11]. Contraction in the muscle is due to neurostimulation through the motor endplate which releases calcium from the sarcoplasmic reticulum to the sarcoplasm. The physiological consequences of  $\text{Ca}^{2+}$  level increase prior to slaughter include a rise in muscle hypermetabolism which leads to postmortem warming and acidosis in the muscle tissue [12].

Three homologous isoforms of ryanodine receptors were identified in non-mammalian tissues based on molecular, immunological, biochemical, and physiological results [13,14]. Adult mammals predominantly express RyR1 isoform in the skeletal muscle, while non-mammalians, including fish, express the two isoforms, RyR1 and RyR3 [15]. The RyR2 isoform is expressed primarily in the cardiac tissue of teleost fish [11]. The two RyR isoforms (1 and 3) are encoded by different genes [9]

and are present in similar quantities in the muscle [13].

Due to the importance of the water-holding capacity in the fish industry, the genetic causes that affect this parameter were assessed. Studies on fish that link skeletal muscle RyR expression with ante-mortem acute stress and meat quality are not yet extant. Current analysis evaluated transport-provoked stress and its influence on water-holding capacity and RyR gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

## Materials and Methods

Method was carried out in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA; <http://www.cobea.org.br>) and was approved by the Committee for Ethics on the Use of Animals in Research (CEAE) of the Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR Brazil (Protocol 007/2013-CEAE, March 2013).

## Animals

The fish were grown in net-tanks located in the Rio do Corvo, municipality of Diamante do Norte PR Brazil (22°39' S; 52°46' W). Further, 1,600 juvenile tilapias were sexually reversed with 17- $\alpha$ -methyl-testosterone masculinizing hormone provided in the diet during the larval stage. The fish were derived from the sixth generation of the Genetic Improvement of Nile tilapia Program, GIFT/TILAMAX variety, from the Universidade Estadual de Maringá. The animals had a mean weight  $69.75 \pm 9.92$  g and were conditioned at a 9.3 kg/m<sup>3</sup> average initial density in two 6 m<sup>3</sup> net-tanks. The fish were fed three times a day on a commercial ration containing 32% crude protein and 3500 Kcal/kg digestible energy, during 210 days, from March to October 2013. Prior to

the experiment, the animals fasted for 24h to empty the digestive tract.

## **Experimental Design**

An experiment with different density and transportation times was performed to simulate different conditions and thus differentiate levels of ante-mortem acute stress in tilapias. The experiment was conducted in a 3x4 factorial scheme, comprising three densities (100, 200, and 400 live weight kg /m<sup>3</sup>) and four transportation times (60, 120, 180 and 240 minutes) and a control treatment (fish removed from the tanks and immediately euthanized). There was a total of 13 treatments, with 10 repetitions per treatment (the fish was the experimental unit), in a total of 130 fish (866.86±143.98 g average weight and 33.80±1.63 cm overall length).

Three 1000-L fiberglass transportation boxes, equipped with diffusers and oxygen cylinders, were used to transport the live fish. Temperature and dissolved oxygen were tracked during transportation by a portable apparatus (YSI Model 55 Dissolved oxygen, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA) to maintain a 25.44±1.29°C average temperature and 8.05±3.19 mg/L average dissolved oxygen. Further, 6 mg/L of sodium chloride were added to the water.

Initially, the fish were randomly removed from the net-tanks with a scoop net; they were weighed on a portable scale and placed into three transportation boxes. Each box contained a different density (100, 200 and 400 kg of fish/m<sup>3</sup>). The boxes were placed on a truck and transported at different time marks (60, 120, 180, and 240 min); at the end of each time point, transportation was stopped and 10 animals were removed from each density treatment.

The fish were transported in local roads at speeds mimicking commuting between harvest and processing unit (around 30 mph). The samples were taken in a processing

facility, and transport times (60, 120, 180 and 240 min) were coordinated with the arrival of the truck to the processing unit. Each sample lasted for about five minutes, and during this time the transport truck stood still.

Fish from each treatment were removed from the boxes and anesthetized with benzocaine at a proportion of 1 g/10mL alcohol/10L water; blood was then collected from five fish by caudal puncture for cortisol analysis and muscle collection for gene expression. The fish were euthanized by dissection of the spinal cord, conditioned in water and ice, and their ventral abdominal cavity was opened from the urogenital orifice up to the jaw bones, followed by the careful removal of the viscera. The fish were beheaded, skin was removed and filleting was done manually. The whole skinless fillets with fillet parings (V-cut fillets) were washed in 5 ppm chlorinated water, packed and refrigerated (4°C) until analysis.

## **Cortisol analysis**

Two milliliters of blood from each fish (n=5) were collected by caudal puncture with disposable syringes and serum was obtained after immersing blood samples in a warm water bath at 37°C for 10 minutes, followed by centrifugation at 1000 xg for 10 minutes and collection of the supernatant (serum). The analysis of serum cortisol concentration was performed by chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA) with Architect Ci8200 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill, USA) with reagents of the same brand.

## **pH, color and water-holding capacity**

Indicators of fillets quality were evaluated by pH, color and water-holding capacity (WHC). Color and pH were analyzed in refrigerated samples, while WHC was

performed from frozen fillets. Further, pH was measured at 36 hours post-mortem by direct insertion in the muscle of pH-meter Toledo Mettler (model 1140, Mettler-Toledo, Woburn, MA), linked to a glass electrode Mettler Toledo MG.DXK.

The color of the fillets was determined 36 hours post-mortem with a direct color reader (MINOLTA model CR-10; Minolta Camera Co., Osaka, Japan) to obtain the color rates: L\*(brightness/darkness) and b\* (yellowness/blueness). Measurements were taken from the ventral face of the fillet, at six different places, and averaged.

For WHC analysis, fillet samples (n=10) were defrosted and weighed with an analytical scale (Shimadzu AUY-220, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan); 1 g of raw fillet, in triplicate, were placed in 1.5 mL tubes with filter paper. The tubes were centrifuged at 1318 xg for 4 minutes at 4°C in an Eppendorf centrifuge (model 5430R, Eppendorf North America, New York, USA). The samples were weighed after centrifugation and dried in a Fanem buffer (model Orion 515, Fanem, São Paulo, Brazil) at 70°C for 12 hours. The dry samples were weighed once more and the equation below (1) was used to calculate WHC:

$$WHC\% = \frac{PCSW - DSW}{ISW} \times 100, \quad (1)$$

where WHC% = Water-Holding Capacity; ISW = Initial Sample Weight; PCSW = Post-Centrifugation Sample Weight; DSW = Dry Sample Weight.

## Gene Expression

Approximately 2 g of white muscle from 5 fish were collected from each treatment to evaluate RyR1 and RyR3 gene expression in the different treatments. The muscle samples were stored in an RNA Holder (BioAgency Biotecnologia, Brazil) at -20°C until RNA extraction. Total RNA was extracted with a Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad

CA, USA) following manufacturer's instructions, at a proportion of 1 mL per 100 mg of tissue. All materials used were previously treated with RNase inhibitor - RNase AWAY (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Samples were measured by a spectrophotometer (Picodrop Limited, Hinxton, UK) to evaluate total RNA concentration. The RNA integrity was evaluated in 1% agar gel colored with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) and viewed in a transilluminator with ultraviolet light. RNA samples were treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for possible genomic DNA waste removal, according to manufacturer's recommendations. Further, cDNA was performed with SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), following manufacturer's instructions. Samples were stored at -20°C until use.

For real time PCR reactions, the fluorescent dye Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) was used, following manufacturer's instructions. All analyses were performed in a 25 µL-glass, in duplicates. The reactions were conducted in strips in a BIORAD iQ5 iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) appliance.

The primers in the reactions followed sequences at site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) for type 1 ryanodine receptor protein – RyR1 (XM\_005474818.1) gene and type 3 ryanodine receptor protein - RyR3 (XM\_005453445) for *Oreochromis niloticus* was determined according to site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). RyR1 primers provided sequences F: TTCTACCAACACCCCAATCTG and R: AGTAACACAGGAAACGACAGC, with amplicon size 143 bp, whereas RyR3 primers provided sequences F: TGTTTCATCTGTGGGATCGG and R: GTGTGCTCTGTCTCATCCTTG, with amplicon size 140 bp. The expression levels of the Nile tilapia's RyR1 and RyR3 genes were calculated according to the expression of β-actin housekeeping gene

(XM\_003455949) by primer developed by Yang et al. [16] (F: TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG and R: CTGTTGGCTTTGGGGTTCA, amplicon size 217 bp).

The primers for genes (RyR1 and RyR3) analyzed in current study proved to be adequate for real-time PCR analysis. Amplification efficiency was similar to the genes which ranged between 90 and 110%. Analysis of the dissociation curve revealed neither the presence of unspecific products nor the formation of dimers of the primers. The above demonstrates the reliability of data in the mRNA expression of the studied genes. The statistical analysis of  $\beta$ -actin as endogenous control did not reveal any statistically significant difference between the treatments and proved their efficiency as an endogenous control.

## **Statistical analysis**

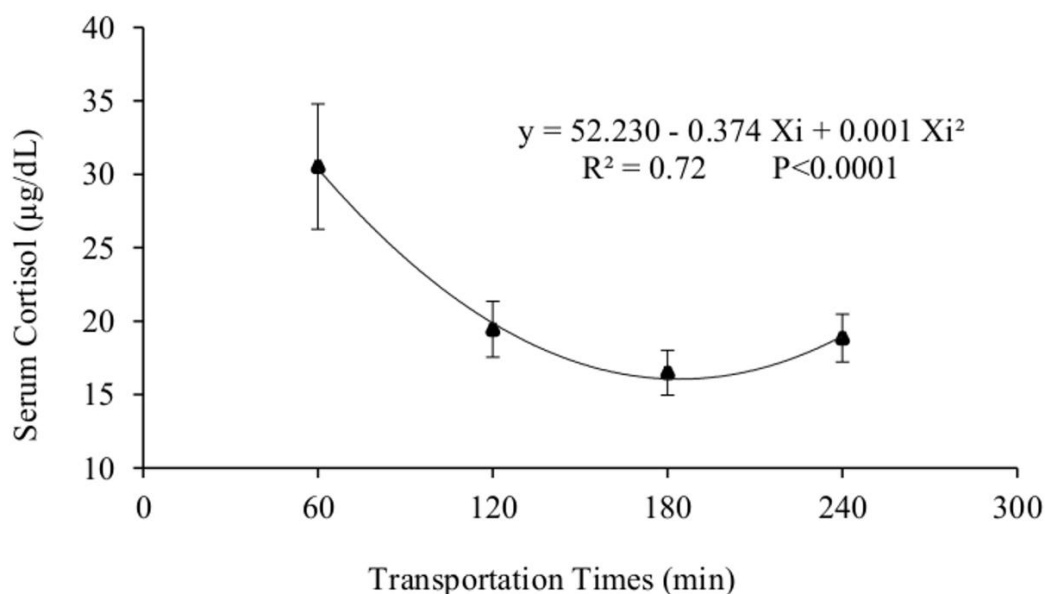
The  $2^{\Delta\Delta CT}$  method was used for the relative quantification analysis, with data in arbitrary units. Data obtained in the cortisol analyses, pH, colorimetry, water-holding capacity, and RyR1 and RyR3 gene expression were submitted to variance analysis by GLM procedure from the statistical computer program Statistical Analysis System (SAS, SAS Inst. Inc. Cary, NC, USA). Density effect, transportation time and interaction among factor were evaluated. When a significant difference ( $P < 0.05$ ) was noted in the density factor, Tukey's test was applied, while the time factor was submitted to a regression analysis at 5% significance. Treatments were also compared with control treatment by Dunnet's test. The results are expressed as averages and standard error of the mean.

## Results

### Stress characterization

Cortisol serum levels were evaluated to characterize stress. Transportation density did not have any effect ( $P=0.6229$ ), with averages  $20.84\pm 1.93$ ,  $22.47\pm 2.19$  and  $23.36\pm 2.95$   $\mu\text{g/dL}$  respectively for densities 100, 200 and 400  $\text{kg/m}^3$ . Similarly, the interaction between density and transportation time did not have any effect ( $P=0.2204$ ) on cortisol serum levels.

Transportation time had a significant effect since the quadratic regression ( $P=0.0001$ ) had the best adjustment to the data (equation  $y=52.230 - 0.374 X_i + 0.001 X_i^2$ ,  $R^2=0.72$ ) (Fig. 1). Highest cortisol level ( $30.52$   $\mu\text{g/dL}$ ) occurred after 60 minutes of transportation and the lowest cortisol level ( $16.49$   $\mu\text{g/dL}$ ) occurred after 180 minutes. When treatment and control cortisol levels were compared, only treatment 400  $\text{kg/m}^3$  + 60 min had a different average ( $41.02$   $\mu\text{g/dL}$ ) from control ( $P<0.01$ ) ( $13.34$   $\mu\text{g/dL}$ ).



**Fig. 1. Stress characterization.** Serum cortisol averages from Nile tilapia submitted to different transportation times (60, 120, 180, and 240 minutes). Vertical lines represent the standard error of the mean between the fifteen replications per time of transportation.



## pH, color and water-holding capacity

The interaction between density and transportation time did not significantly affect ( $P>0.05$ ) the pH and color ( $L^*$  and  $b^*$ ) parameters of the fillets (Table 1).

**Table 1.** pH and colour values of Nile tilapia fillets submitted to different transportation densities (100, 200, and 400 kg/m<sup>3</sup>) and different transportation times (60, 120, 180, and 240 minutes)

Densities (kg/m <sup>3</sup> )	Time (min)	pH	L*	b* <sup>1</sup>
100	60	6.16±0.06	46.10±0.24	8.09±0.15
	120	6.20±0.09*	44.38±0.65	7.25±0.14
	180	6.04±0.06	43.90±0.45	7.57±0.25
	240	6.09±0.06	45.23±0.57	7.62±0.32
200	60	6.00±0.11	44.99±0.35	7.97±0.29
	120	6.05±0.13	45.29±0.35	7.29±0.22
	180	6.07±0.08	45.07±0.41	7.78±0.29
	240	6.11±0.06	43.88±0.42	7.55±0.23
400	60	6.04±0.06	45.64±0.44	8.20±0.24
	120	5.91±0.06	45.04±0.53	8.20±0.28
	180	6.20±0.06*	45.32±0.65	7.83±0.32
	240	6.12±0.04	44.77±0.42	7.96±0.24
<b>Control</b>		5.85±0.12	45.08±0.51 <sup>NS</sup>	8.16±0.21 <sup>NS</sup>
<b>Densities (kg/m<sup>3</sup>)</b>				
100		6.12±0.03	44.87±0.27	7.63±0.12B
200		6.06±0.04	44.80±0.20	7.64±0.13B
400		6.07±0.04	45.19±0.25	8.05±0.13A
<b>Times (minutes)</b>				
60		6.07± 0.04	45.58±0.21	8.08±0.13
120		6.05±0.06	44.90±0.30	7.58±0.15
180		6.10±0.04	44.76±0.31	7.73±0.16
240		6.11 ±0.03	44.63±0.28	7.71±0.15
<b>Densities x times effect</b>		0.1155	0.0555	0.6071
<b>Densities effect</b>		0.4342	0.485	0.0359 <sup>a</sup>
<b>Times effect</b>		0.7773	0.0711	0.0949

<sup>1</sup>L\*: brightness/darkness; b\*: yellowness/blueness

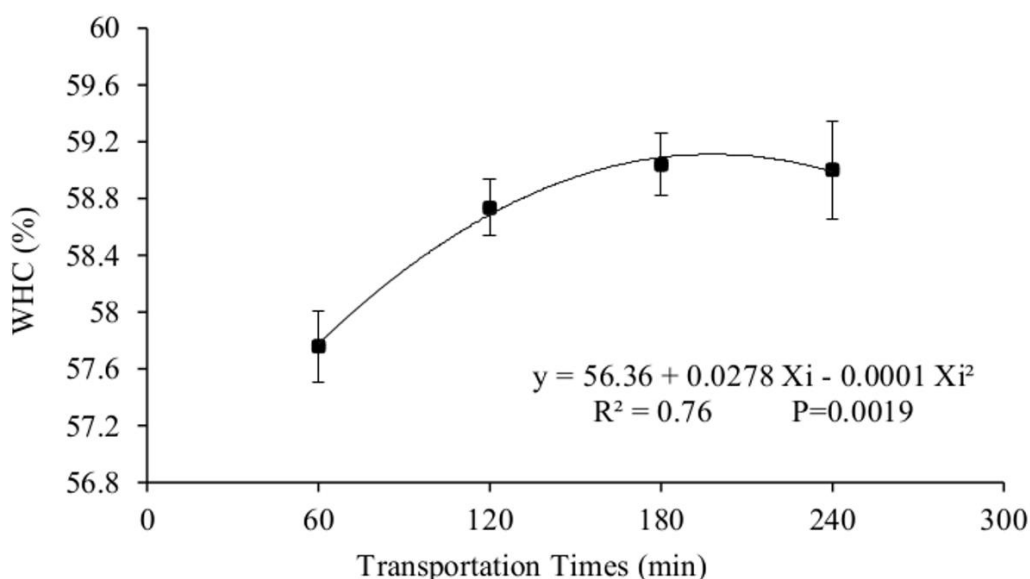
\* indicates a difference in treatments from the control based on Dunnett's test;

<sup>a,B</sup> Means in the same column followed by different letters differ by Tukey's test. Values are expressed as the mean ± standard error of the mean (n=10).

NS = Non-significant

Transportation time showed no significant regression ( $P>0.05$ ) when independently analyzed. Isolating the density factor, there was a significant effect only for chroma  $b^*$  ( $P=0.0359$ ), a higher mean (8.05) for density  $400 \text{ kg/m}^3$ . In the case of pH, when comparing treatment averages with control, it was observed that treatments  $100 \text{ kg/m}^3 + 120 \text{ min}$  and  $400 \text{ kg/m}^3 + 180 \text{ min}$  had average pH (6.20 and 6.20 respectively) significantly higher ( $P<0.05$ ) than the control treatment mean (5.85).

In the case of water-holding capacity (WHC), only transportation time had a significant effect ( $P=0.0019$ ), as the quadratic regression equation was the best fit for the data ( $y=56.36 + 0.0278X_i - 0.0001X_i^2$ ,  $R^2=0.76$ ) (Fig. 2). WHC increased as time increased, until 180 minutes, which had the maximum of 59.04% of WHC. In comparison to control treatments, treatments  $200 \text{ kg/m}^3 + 60 \text{ min}$  and  $200 \text{ kg/m}^3 + 240 \text{ min}$  had different averages (57.19% and 59.64% respectively) from the control (58.33%) by Dunnett's test ( $P=0.0235$ ).

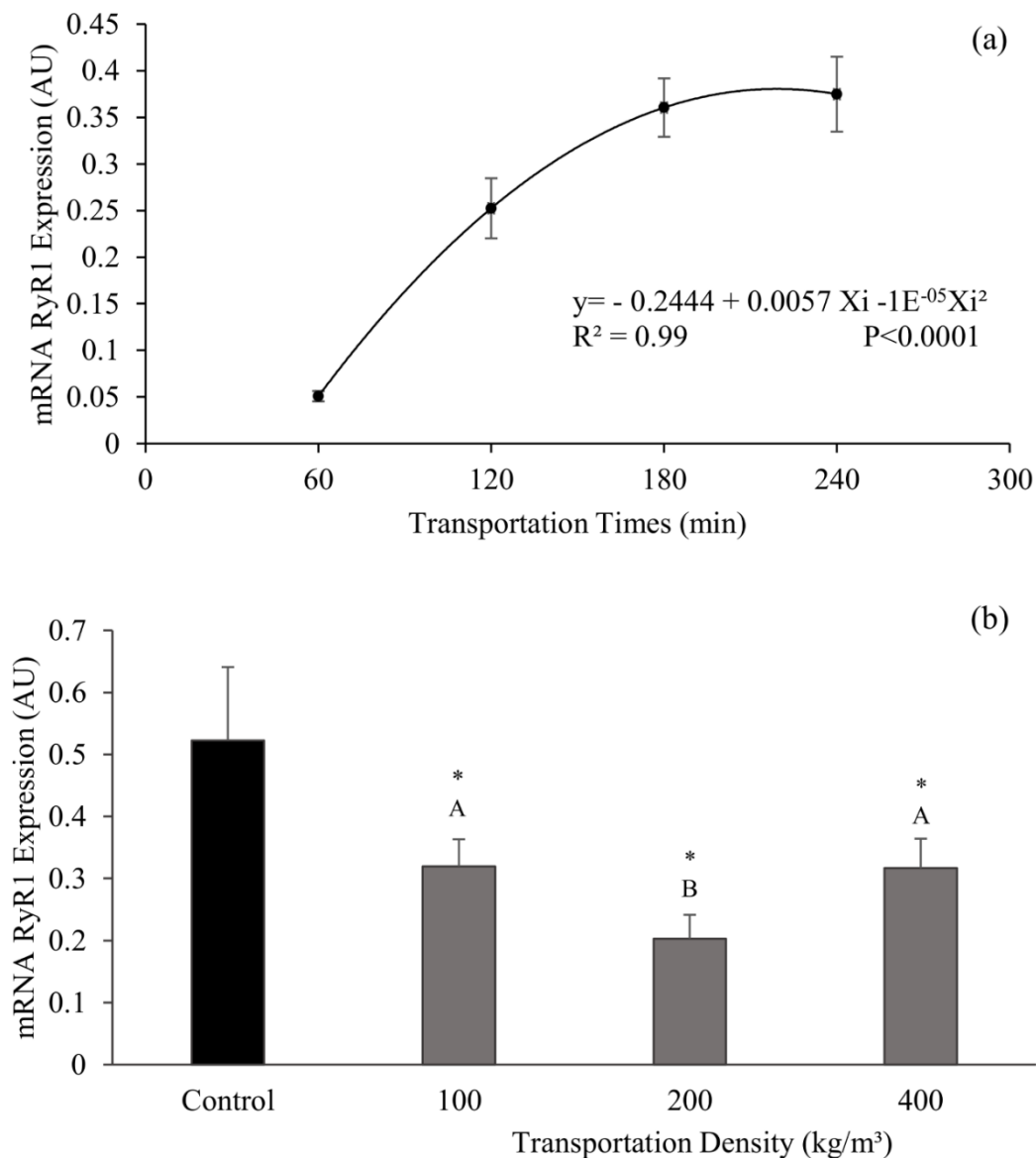


**Fig. 2. Water Holding Capacity of fillets.** Water Holding Capacity (WHC%) in Nile tilapia fillets submitted to different transportation times (60, 120, 180, and 240 minutes). Vertical lines represent the standard error of the mean between the thirty replications per time of transportation.

## Ryanodine receptor protein gene expression

For type 1 ryanodine receptor protein (RyR1) gene expression, there was no significant difference in the interaction between density and transportation time ( $P=0.2424$ ). However, the isolation of time and density factors was significant ( $P<0.01$ ). In the case of transportation time (Fig. 3a), a quadratic regression occurred ( $y = -0.2444 + 0.0057X_i - 1E^{-05}X_i^2$ ,  $R^2=0.99$ ) for mRNA RyR1 expression in which 60 min time showed the lowest expression level (0.036 AU), with an increase until 240 min (0.400 AU). When different transportation times were compared with control treatment by Dunnett's test, there was a significant difference ( $P<0.0001$ ) between average times 60, 120, and 180 min. In fact, they demonstrated a lower expression of RyR1 mRNA when compared to control (0.523 AU).

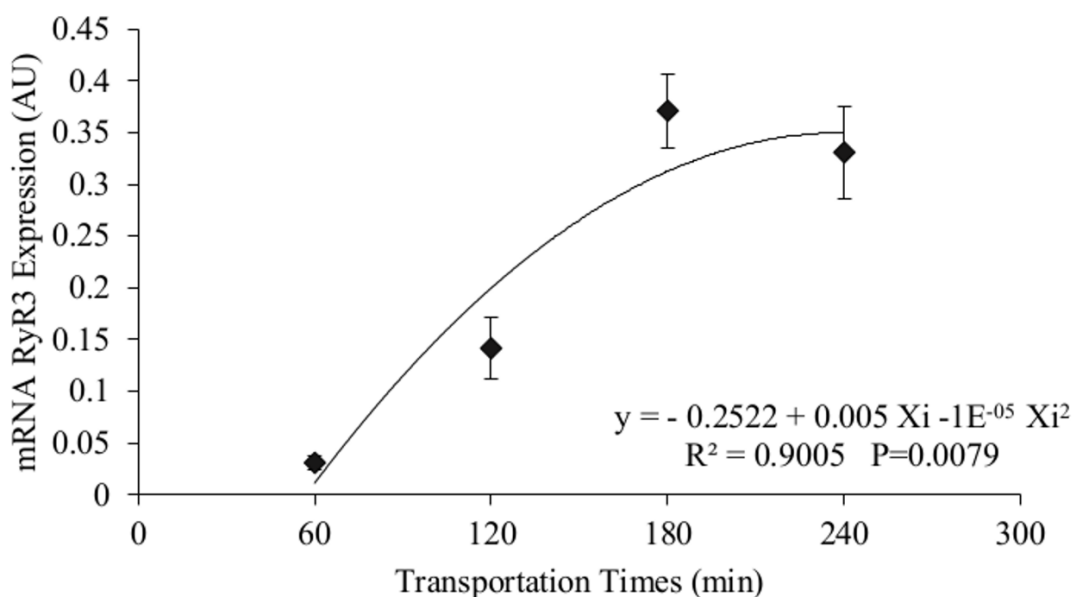
There was a difference ( $P=0.0044$ ) in mRNA RyR1 in the isolation of the transport density factor. Average density (200 kg/m<sup>3</sup>) showed a lower expression (0.203 AU) when compared to the other densities (Fig. 3b). When densities are compared to control treatment, a significant difference ( $P=0.0004$ ) was noted. Densities had a mean lower expression when compared to control.



**Fig. 3. Protein receptor ryanodine type 1 gene expression in muscle.** Nile tilapia mRNA RyR1 expression submitted to different transportation times (60, 120, 180, and 240 minutes) (a) and different transportation densities (100, 200, and 400 kg/m<sup>3</sup>) (b). Different letters show significant differences between treatments by Tukey's Test ( $P=0.0044$ ). (\*) indicates a difference in treatments from the control based on Dunnett's test ( $P<0.05$ ). AU is abbreviation for Arbitrary Unit. In Fig 3a, vertical lines represent the standard error of the mean between the fifteen replications per time of transportation; and in Fig 3b, vertical bars represent the standard error of the mean between the twenty replications per transportation density (control is  $n=5$ ).

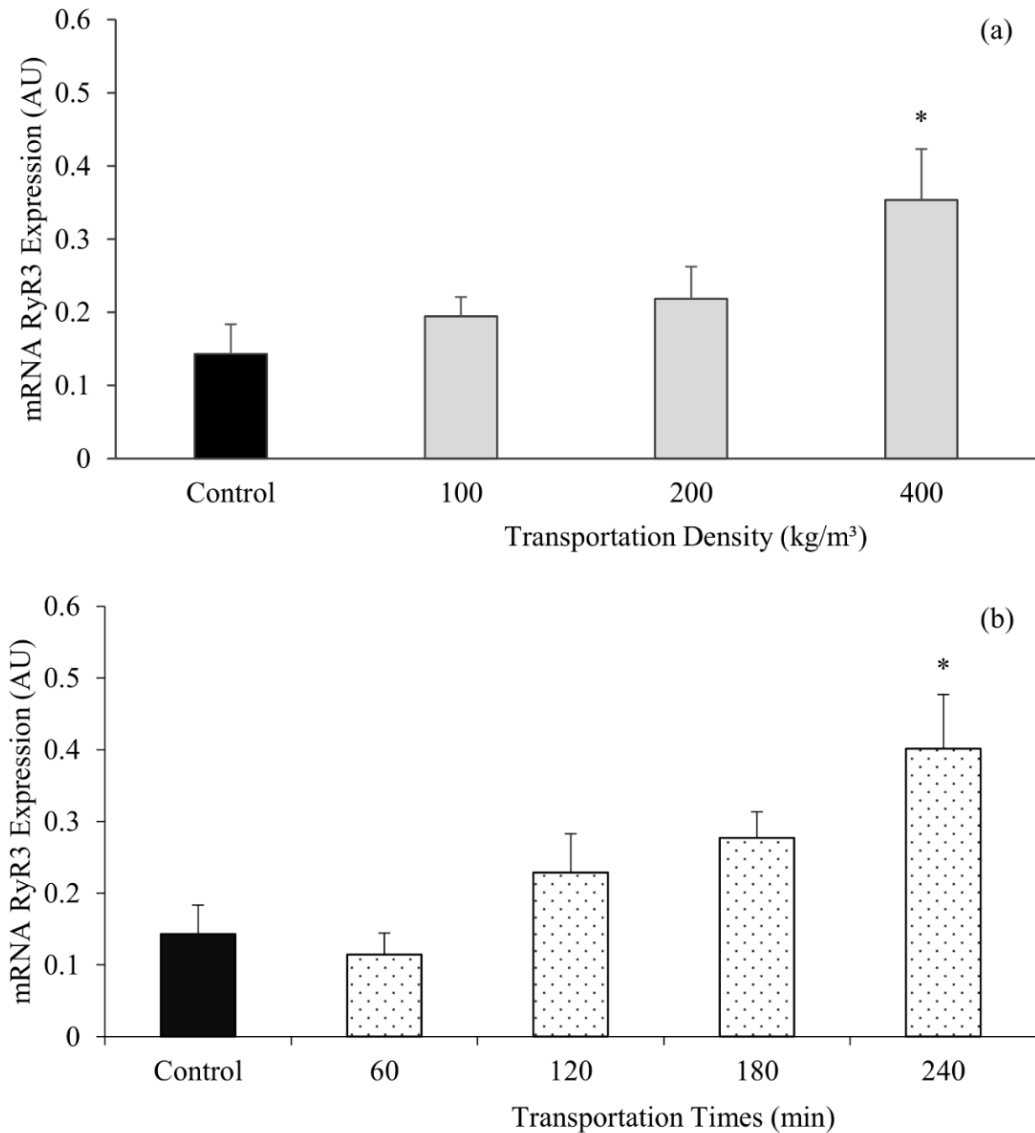
A significant interaction between density and time factors ( $P=0.004$ ) was observed when type 3 mRNA ryanodine receptor protein (RyR3) expression was

assessed. During interaction, a significant effect of regression on different transportation times was not detected for densities 100 and 400 kg/m<sup>3</sup>; however, a quadratic effect could be perceived at 200 kg/m<sup>3</sup> density ( $y = -0.2522 + 0.005X_i - 1E^{-05}X_i^2$ ,  $R^2=0.90$ ), where the lowest mRNA RyR3 expression was reported at 60 minutes of transportation (0.031 AU) and the highest value at 180 minutes (0.371 AU) (Fig. 4).



**Fig. 4. Protein receptor ryanodine type 3 gene expression in muscle.** mRNA RyR3 expression in Nile tilapia muscle submitted to 200 kg/m<sup>3</sup> density at different transportation times (60, 120, 180, and 240 minutes). AU is abbreviation for Arbitrary Unit. Vertical lines represent the standard error of the mean between the fifteen replications per time of transportation.

Comparison of means for different transportation times with control treatment revealed a significant difference ( $P < 0.05$ ) only at 240 min, which showed a higher mRNA RyR3 average (0.401 AU) when compared to control treatment (0.143 AU) (Fig. 5a). Fish from the 400kg/m<sup>3</sup> density had the highest average (0.353 AU) when mRNA RyR3 averages of different transportation densities were compared to control (Fig. 5b).



**Fig. 5. Protein receptor ryanodine type 3 gene expression in muscle.** Nile tilapia mRNA RyR1 expression submitted to different transportation densities (100, 200, and 400 kg/m<sup>3</sup>) (a) and different transportation times (60, 120, 180, and 240 minutes) (b). (\*) indicates a difference in treatments from the control based on Dunnett's test (P<0.05). AU is abbreviation for Arbitrary Unit. Vertical bars represent the standard error of the mean between the twenty replications (Fig. 5a) per transportation density, and fifteen replications (Fig. 5b) per time of transportation (control is n=5).

## Discussion

Fish capture, handling, and transportation are traumatic procedures that may cause severe physiological reactions, such as increased muscle activity, muscle and liver energy reserve mobilization and alterations in the acid-base blood balance [17]. In fish, the most commonly used plasmatic cortisol is the stress indicator since stress increases cortisol levels [18]. In current study, soon after capture, high cortisol rates were noted until 60 minutes of transportation. As transportation time elapsed to 180 minutes, a decreased concentration was detected and evidenced adaptation to transport conditions. According to Poli [19], cortisol plasmatic levels quickly increase after exposure to acute stress, and standard conditions are restored in a few hours. This demonstrates that fish have a great capacity to acclimate to new environmental conditions, albeit with reduced performance. Some degree of stress appears to have been experienced also by the fish in the control group due to handling, possibly combined with increased swimming activity prior to slaughter. This observation was also made by Hultmann et al. [20] for the Atlantic cod (*Gadus morhua*).

Vigorous swimming leads to the intense usage of the white muscle, an increase in anaerobic glycolysis and lactic acid production, a decrease in muscle pH [2, 3, 4]. Higher pH rates (6.20) were observed in fish from treatments that had lower cortisol concentrations, such as treatments 100 kg/m<sup>3</sup> + 120 min (16.62 µg/dL) and 400 kg/m<sup>3</sup> + 180 min (12.92 µg/dL). Thus less stressed animals apparently produced flesh with higher pH when compared to others, although this fact cannot be confirmed with isolated transportation time which significantly characterized the stress. The rapid decrease in postmortem pH is a classic indicator of stress before slaughter in many species such as pigs and poultry. It has also been reported in fish, or rather, low initial postmortem pH is associated with high stress ante-mortem [21], described by

numerous authors for salmon [22, 23], eel [24, 25] and gilt-head bream [26].

Greatly stressed fish may develop high luminous flesh due to a decrease in the level of soluble muscle proteins, when these are compared to slaughtered non-stressed animals [27]. However, no relationship was found in current experiment between transportation stress and luminosity in the Nile tilapia fillets. Fillets of Atlantic cod, subjected to stress on exposure to air, developed higher luminosity when compared to those slaughtered without any stress [28]. Stress from electricity in the rainbow trout increased flesh luminosity when compared to anesthetized fish [27]. Likewise, fillets of the common carp (*Cyprinus carpio*) under narcosis with CO<sub>2</sub> manifested greater luminosity when compared to fish treated with anesthetic, water and ice, and asphyxia [4].

Highest chroma b\* mean (8.05) was recorded for density 400 kg/m<sup>3</sup>. In absolute values, this density was also observed for the highest average serum cortisol. Although transportation time has not affected chroma b\*, apparently the density was able to promote change in color of fillets.

The water holding capacity (WHC), the meat's capacity to retain water during external forces, is highly important for commercial value and consumers' acceptance, since it is related to succulence [29, 30]. Transportation time significantly affected WHC in current assay. The parameter increased as transportation time increased, ranging between 57.76% at 60 minutes and 59.01% at 240 minutes. Since the highest serum cortisol rates were observed at 60 minutes transportation time, it may be inferred that stressed fish developed meat with less WHC. The parameter increased as stress decreased. The Atlantic cod subjected to stress before slaughter developed meat with low water-holding capacity when compared to that in non-stressed fish [20].

Lund et al. [29] reported that the muscle capacity to retain water is affected by



many factors, such as pH, postmortem protein oxidation, proteolytic activity of meat tenderizer enzymes, and cross-linking of myofibrillar proteins. On the other hand, low proteolytic activity may negatively influence WHC and meat succulence [6].

The genetic factors linked to changes in muscle WHC are related to alterations in the activity of ryanodine receptors (RyR) which may decrease the capacity to control calcium release to the muscle's cell cytoplasm, especially under physical stress periods [6]. The excess calcium in the cytosol causes rapid muscular contractions, consequently speeding anaerobic metabolism and post-mortem glycolysis, which drastically decreases muscular pH. Consequently, the muscle capacity to retain water contained in intracellular storage is affected.

In current study, the RyR1 gene expression at different transportation times provided similar responses to those observed in WHC. If the fish were at a high stress level in 60 minutes of transportation time, it was expected that the RyR1 gene expression would be lower. Increasing transportation time, and thus a decrease in stress, led to a greater RyR1 activity. In fact, the isoform started to regulate calcium release from the sarcoplasmic reticulum to the cytoplasm, which positively affected the muscle's WHC. These results demonstrate for the first time the association of mRNA RyR1 expression with WHC in the Nile tilapia.

The relationship between RyR1 gene expression and animal's stress may also be demonstrated by comparing the same expression with control treatment. The highest mRNA RyR1 expression (0.523 AU) and the lowest serum cortisol concentration (13.34 µg/dL) were registered in control.

The RyR3 gene expression was significant for the 200 kg/m<sup>3</sup> density. In this case, a quadratic regression occurred. In fact, increased transportation time to 180 minutes was also accompanied by increase in mRNA RyR3 expression, with a similar behavior

for RyR1, cortisol serum and WHC.

In current assay, the lowest WHC in stressed tilapias may be due to a lower mRNA RyR1 expression which, by decreasing its potential control for  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular storage, produced excess  $\text{Ca}^{2+}$  ion in the cytosol, thereby causing hypermetabolism and increased muscular contraction. The above situation possibly reduced postmortem pH and protein denaturation, with higher water loss in the meat [27]. In broilers and laying chickens, the  $\beta$ -RyR isoform (or RyR3) was lower in meat with a low WHC (characterized as pale, soft and exudative [PSE] meat), whereas there was no difference between normal and PSE meats for  $\alpha$ -RyR (or RyR1) gene expression [10].

The calcium release mechanism in the skeletal muscle of non-mammals involves  $\alpha$ -RYR isoform, which is coupled to the dihydropyridine receptor protein (DHPR) [9]. In the muscular contraction process, the muscular fiber is stimulated through the nerve (motor endplate) and generates the action potential that spreads along the membrane surface and through the transverse tubule system towards the deepest parts of the muscular fiber. The DHPR detects the membrane depolarization, alters its conformation and activates the  $\alpha$ -RYR which releases  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarcoplasmic reticulum [31]. On the other hand, the  $\beta$ -RyR is not bonded to DHPR but is situated peripherally at the sarcoplasmic reticulum tubule T junction, and its activity is differently regulated. Part of  $\text{Ca}^{2+}$  released by  $\alpha$ -RYR binds to the cytoplasmic domain of the  $\beta$ -RyR duct and opens it by releasing the calcium [9].

This mechanism possibly explains the different results obtained for RyR1 and RyR3 in the present study, where RyR1 was perfectly adjusted to the fish stress condition as a direct response in WHC. Therefore, it is possible that the defect in the calcium regulation occurs in the two isoforms, but mainly in the gene that encodes

RyR1.

A ryanodine receptor protein gene mutation in swine was associated with stress-susceptible animals and prone towards the development of PSE meat [32]. Since the  $\beta$ -RyR (RyR3 homologous) isoform in chickens was expressed less in animals that developed PSE meat [10], these types of meat could be the result of a high  $\text{Ca}^{2+}$  cytosol availability.

Results in current assay show for the first time in fish the relationship between the expression of ryanodine receptor gene encoders, ante-mortem stress and water-holding capacity, specifically in Nile tilapia.

Results demonstrated that the increase in transportation time up to the 180 minute mark led to a decrease in stress, expressed by serum cortisol rates. Stressed fish presented lower RyR1 gene expression and a lower meat water-holding capacity. Decrease in stress led to a linear increase in these parameters until 180 minutes. Results provided the first evidence that pre-slaughter stress affects the ryanodine receptor gene expression and, consequently, the fillet's water-holding capacity due to the increased availability of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . Future prospects based on this study predict the possibility, similar to that in other animal species, the early identification of stress-prone specimens and the development of meat with low water-holding capacity.

## Competing Interests

The authors have declared that no competing interests exist.

## References

1. Dobšíková R, Svobodová Z, Blahová J, Modrá H, Velíšek J. Stress response to

- long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno. 2006, 75, 437-448. doi:10.2754/avb200675030437
2. Lowe TE, Ryder JM, Carragher JF, Wells RMG. Flesh quality in snapper, *Pagrus auratus*, affected by capture stress. J. Food Sci., 1993, 58, 770–773. doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb09355.x
  3. Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. Aquacult Int., 2005, 13, 29-49. doi: 10.1007/s10499-004-9035-1
  4. Rahmanifarah K, Shabanpour B, Sattari A. Effects of clove oil on behavior and flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in comparison with pre-slaughter CO<sub>2</sub> stunning, chilling and asphyxia. Turkish J Fish Aquat Sci, 2011, 11, 139-147. doi: 10.4194/trjfas.2011.0118
  5. Olsson GB, Olsen RL, Ofstad R. Post-mortem structural characteristics and water-holding capacity in Atlantic halibut muscle. LWT-Food Sci Technol, 2003, 36(1), 125-133. doi: 10.1016/S0023-6438(02)00205-0
  6. Huff-Lonergan E, Lonergan SM. Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of post-mortem biochemical and structural changes. Meat Sci., 2005, 71, 194–204. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.04.022
  7. Bagni M, Civitareale C, Priori A, Ballerini A, Finoia M, Brambill A, et al. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 2007, 263, 52-60. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.049
  8. Erikson U, Sigholt T, Seland A. Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 1997, 149, 243–252. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01453-6

9. Strasburg GM, Chiang W. Pale, soft, exudative turkey—The role of ryanodine receptor variation in meat quality. *Poult. Sci.* 2009, 88, 1497-1505. doi: 10.3382/ps.2009-00181
10. Oda SHI, Nepomuceno AL, Ledur MC, Oliveira MCN, Marin SRR, Ida, EI, et al. Quantitative differential expression of alpha and beta ryanodine receptor genes in PSE (pale, soft, exudative) meat from two chicken lines: broiler and layer. *Braz Arch Biol Techn*, 2009, 52, 1519-1525. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000600024>
11. Darbandi S, Franck JPCA. comparative study of ryanodine receptor (RyR) gene expression levels in a basal ray-finned fish, bichir (*Polypterus ornatipinnis*) and the derived euteleost zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 2009, 154, 443–448. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.09.003
12. Droval AA, Binneck E, Marin SRR, Paião FG, Oba A, Nepomuceno AL, et al. A new single nucleotide polymorphism in the ryanodine gene of chicken skeletal muscle. *Genet Mol Res*, 2012, 11, 821-829. doi <http://dx.doi.org/10.4238/2012.April.3.4>
13. Airey JA, Baring MD, Beck CF, Chelliah Y, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. Failure to make normal  $\alpha$  ryanodine receptor is an early event associated with the Crooked Neck Dwarf (cn) mutation in chicken. *Dev. Dynam.*, 1993, 197, 169–188. doi: 10.1002/aja.1001970303
14. Olivares, EB, Tanksley, SJ, Airey, JA, Beck, CF, Ouyang, Y, Deerinck, TJ, et al. Nonmammalian vertebrate skeletal muscles express two triad junctional foot protein isoforms. *Biophys. J.*, 1991, 59, 1153e1163. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82331-1
15. Franck JP, Morrissette J, Keen JE, Londraville RL, Beamsley M, Block BA. Cloning

- and characterization of fiber type-specific ryanodine receptor isoforms in skeletal muscles of fish. *Am. J. Physiol.*, 1998, 275, C401eC415.
16. Yang CG, Wang XL, Tian J, Liu W, Wu F, Jiang M, et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Gene*, 2013, 527(1), 83-192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.013>
  17. Gatica MC, Monti GE, Knowles TG, Gallo CB. Muscle pH, rigor mortis and blood variables in Atlantic salmon transported in two types of well-boat. *Vet. Rec.*, 2010, 166, 45-50.
  18. Tejpal CS, Pal AK, Sahu NP, Kumar JA, Muthappa NA, Vidya S, et al. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Aquaculture*, 2009, 293, 272–277. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.09.014
  19. Poli BM. Farmed fish welfare-suffering assessment and impact on product quality. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2009, 8, 139–160. doi: <http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2009.s1.139>
  20. Hultmann L, Phu TM, 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 chem.*, 2012, 134, 1399-1408. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.038
  21. Skjervold PO, Fjæra SO, Østby PB, Einen O. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 2001, 192, 265-280. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00447-6
  22. Sigholt T, Erikson U, Rustad T, Johansen S, Nordvedt TS, Seland A. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Food Sci.*, 1997, 62, 898-905. doi: 10.1111/j.1365-

2621.1997.tb15482.x

23. Einen O, Guerin T, Fjæra SO, Skjervold PO. Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 2002, 212, 129-140. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00874-2
24. Marx H, Brunner B, Weinzierl W, Holfmann R, Stolle A. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1997, 204, 282-286.
25. Morzel M, Van De Vis H. Effects of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla Anguilla* L.). *Aquacult. Res.*, 2003, 34, 1-11. doi: 10.1046/j.1365-2109.2003.00754.x
26. Matos E, Gonçalves A, Nunes ML, Dinis MT, Dias J. Effect of harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality criteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 2010, 305, 66-72. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.04.020
27. Robb DHF, Kestin SC, Warriss PD. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture*, 2000, 182, 261-269. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00273-2
28. Stien LH, Hirnas E, Bjørnevik M, Karlsen Ø, Nortvedt R, Rørå, AMB, et al. The effects of stress and storage temperature on the colour and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.*, 2005, 36, 1197–1206. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01339.x
29. Lund MN, Heinonen, M, Baron CP, Estévez M. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55, 83–95. doi: 10.1002/mnfr.201000453
30. Wu D, Sun DW. Application of visible and near infrared hyperspectral imaging for non-invasively measuring distribution of water-holding capacity in salmon flesh. *Talanta*, 2013, 116, 266-276. doi: 10.1016/j.talanta.2013.05.030

31. Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F. Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115, 2000-2009. doi:10.1172/JCI25525
32. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, Leon S, Khanna VK, Weiler JE, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hypertermia. *Science*, 1991, 253, 448-451. Doi:10.1126/science.1862346



**QUALIDADE E ANÁLISE SENSORIAL DE FILÉS DE TILÁPIA-DO-NILO**  
**SUBMETIDA AO ESTRESSE PELO TRANSPORTE EM DIFERENTES**  
**DENSIDADES DE ESTOCAGEM E TEMPOS**

Elenice Souza dos Reis Goes<sup>a,\*</sup>, Jorge Antônio Ferreira de Lara<sup>b</sup>, Eliane Gasparino<sup>c</sup>,  
Marcio Douglas Goes<sup>d</sup>, Jovana Silva Garbelini Zuanazzi<sup>a</sup>, Nelson Maurício Lopera-  
Barrero<sup>e</sup>, Maria del Pilar Rodriguez Rodriguez<sup>f</sup>, Pedro Luiz de Castro<sup>g</sup>, Ricardo Pereira  
Ribeiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná 87020-900, Brasil.

<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, 79320-900, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná 87020-900, Brasil.

<sup>d</sup>Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. Universidade Federal do Paraná, Palotina, Paraná 85950-000, Brasil.

<sup>e</sup>Departamento de Zootecnia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brasil

<sup>f</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 39100-000, Brasil.

<sup>g</sup>Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná 87020-900, Brasil

---

\*Autor para correspondência: Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Avenida Colombo, 5790, Bloco J-45 sala 16-A, Maringá Paraná 87020-900 Brasil. Tel. +55 44 3011 5986

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse pré-abate e sua influência sobre indicadores de estresse e características de qualidade e sensoriais de filés de tilápias-do-Nilo. Para tanto, foram realizados dois experimentos: **(1)** dois tempos de transporte (60 e 240 min), com densidade de 200 kg/m<sup>3</sup>, comparando com peixes do tratamento controle (onde os peixes foram retirados do tanque-rede e imediatamente eutanasiados); e **(2)** duas densidades de transporte (100 e 400 kg/m<sup>3</sup>), com transporte por 180 minutos, comparando com peixes do tratamento controle. No experimento 1, o tempo 60 min acarretou em maior concentração de cortisol sérico e de glicose plasmática em relação ao tempo 240 min e ao controle. Filés de peixes transportados por 240 min tiveram maior capacidade de retenção de água, menor perda de água por pressão e maior aceitação no atributo suculência, em relação a peixes transportados por 60 min. pH, cor e perda de água por cozimento não foram afetados pelo tempo de transporte. No experimento 2, as densidades de transporte 100 e 400 kg/m<sup>3</sup> não afetaram significativamente os indicadores de estresse e parâmetros de qualidade instrumental dos filés, porém peixes transportados em 400 kg/m<sup>3</sup> apresentaram melhor aceitação visual pelos provadores.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Oreochromis niloticus*, pH, colorimetria, capacidade de retenção de água, análise sensorial.

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse pré-abate é uma questão importante para a indústria, pois influencia diretamente o bem-estar e a qualidade da carne dos animais. Em peixes, vários estudos têm demonstrado que o estresse pré-abate afeta a cor, a textura e a perda de água da carne (Stien et al., 2005; Sveinsdóttir et al., 2010; Rahmanifarah et al., 2011; Digre et al., 2011). Os mecanismos que explicam estas alterações na qualidade da carne estão relacionados ao esgotamento das reservas de glicogênio e ATP do músculo, com aumento da glicólise anaeróbica, devido ao excesso de exercício durante o estresse. Um dos metabólitos resultantes da atividade anaeróbica é o ácido láctico, que se acumula no músculo e provoca a queda do pH (Tavares e Gonçalves, 2011).

Este pH baixo pode ser responsável pelas alterações na qualidade da carne, uma vez que leva a um início precoce do *rigor mortis* (Bahuaud et al., 2010; Roth et al., 2012). Porém, o estresse mecânico das fibras musculares ou do tecido conjuntivo, que causa a liberação de proteases, também pode contribuir para a degradação da estrutura muscular (Roth et al., 2006). A degradação estrutural das proteínas musculares diminui a capacidade de retenção de água da carne (Olsson et al., 2003), ou seja, o músculo perde parte da capacidade de reter água durante o processamento (Jørpeland et al., 2013). Estas alterações na qualidade do músculo advindas do estresse pré-abate diminuem a vida de prateleira e acarretam em prejuízos econômicos para a indústria do pescado.

Dentre as espécies de peixe produzidas mundialmente, as tilápias representam o segundo grupo mais cultivado do mundo, atrás somente das carpas (FAO, 2012). No Brasil, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais cultivada, com produção de 253.824,1 toneladas em 2011 (MPA, 2013). Portanto, o estudo do

estresse pré-abate durante o transporte de peixe vivo até o frigorífico é importante para fornecer subsídios para a indústria aquícola aprimorar as técnicas de manejo do pescado.

O objetivo deste estudo foi avaliar o estresse provocado pelo transporte em diferentes densidades de estocagem e diferentes tempos de transporte e sua influência sobre o estresse, características sensoriais e de qualidade dos filés em tilápias-do-Nilo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O planejamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEAE) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), conforme Parecer nº 010/2013.

### **2.1 Animais**

Os peixes foram cultivados em tanques-rede localizados no Rio do Corvo, município de Diamante do Norte-PR (22°39' S; 052°46' W). Foram utilizados 1.600 juvenis de tilápias-do-Nilo variedade TILAMAX, revertidos sexualmente com uso de hormônio masculinizante 17- $\alpha$ -metil-testosterona na ração fornecida na fase larval. Os animais com peso médio  $69,75 \pm 9,92$  g foram acondicionados na densidade média inicial de  $9,3 \text{ kg/m}^3$  em dois tanques-rede com capacidade para  $6 \text{ m}^3$  (2,0 x 2,0 x 1,5 m) cada, fabricados com estrutura de alumínio, tela com malha de  $\frac{3}{4}$  de polegada, de arame galvanizado revestido com PVC, bóias flutuantes apropriadas para tanques-rede, com comedouros circulares e cobertura do mesmo material.

Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com ração comercial com 32% de proteína bruta e diâmetro de 8 mm, durante 210 dias de março a outubro de 2013.

Antes da realização do experimento de transporte, os peixes (peso médio  $866,86 \pm 143,98$  g e comprimento total  $33,80 \pm 1,63$  cm) permaneceram em jejum por 24 horas para esvaziamento do trato digestório.

## 2.2 Desenho experimental

Como forma de criar diferentes situações de manejo pré-abate onde fosse possível diferenciar níveis de estresse agudo *ante-mortem* nas tilápias, foram realizados dois experimentos com diferentes tempos de transporte (Experimento 1) e densidades de estocagem (Experimento 2), simulando o transporte de peixe vivo após a despesca até o frigorífico. Foram amostrados dez peixes por tratamento, conforme delineamento abaixo:

**Experimento 1:** dois tempos de transporte (60 e 240 min), com densidade de  $200 \text{ kg/m}^3$ , comparando com peixes do tratamento controle (onde os peixes foram retirados do tanque-rede e imediatamente eutanasiados);

**Experimento 2:** duas densidades de transporte ( $100$  e  $400 \text{ kg/m}^3$ ), com transporte por 180 minutos, comparando com peixes do tratamento controle (onde os peixes foram retirados do tanque-rede e imediatamente eutanasiados).

## 2.3 Características do transporte

Foram utilizadas três caixas de transporte de peixe vivo, fabricadas em fibra de vidro com capacidade para 1000 litros, equipadas com difusor e cilindros de oxigênio. As três caixas foram acondicionadas em um caminhão de transporte de peixes.

Inicialmente, os peixes foram retirados aleatoriamente dos tanques-rede com auxílio de um puçá, pesados com uso de balança portátil e colocados nas três caixas de transporte, sendo que em cada caixa foi utilizada uma densidade diferente (100,

200 e 400 kg de peixe/m<sup>3</sup>).

Os peixes foram então transportados por 60, 180 e 240 minutos em estradas locais, em velocidades simulando o transporte entre o local de coleta dos peixes e a unidade de processamento (cerca de 50 km/h). As amostragens foram feitas no Laboratório de Alimentos do Colégio Estadual Agrícola do Noroeste, anexo à UEM, Campus Regional de Diamante do Norte – PR, sendo que os tempos de transporte (60, 180 e 240 min) foram coordenados com a chegada do veículo à unidade de processamento. Cada amostragem durou cerca de cinco minutos, e durante esse tempo o veículo de transporte permaneceu parado.

A temperatura e o oxigênio dissolvido durante o transporte foram monitorados com uso de um medidor portátil (YSI Model 55 Dissolved oxygen, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA), mantendo-se em média  $25,44 \pm 1,29^\circ\text{C}$  para temperatura e  $8,05 \pm 3,19$  mg/L para oxigênio dissolvido. Foram adicionados 6 mg/L de cloreto de sódio na água de transporte dos peixes.

Após a retirada dos peixes da caixa de transporte, procede-se a coleta de sangue por punção caudal para análise de glicemia e cortisol. Após, os peixes foram eutanasiados por secção da medula espinhal, acondicionados em água e gelo e submetidos à abertura ventral da cavidade abdominal, desde o orifício urogenital até os ossos da mandíbula, seguido de retirada cuidadosa das vísceras, para evitar a contaminação da carne com o material fecal. Os peixes foram decapitados, com posterior retirada da pele e filetagem manual. Os filés inteiros sem pele foram lavados em água clorada a 5 ppm, embalados, acondicionados em caixa térmica com gelo e transportados até o Laboratório de Análise de Carnes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Pantanal, localizado na cidade de Corumbá-MS, onde foram realizadas as análises de qualidade da carne.

## 2.4 Indicadores do estresse: glicose e cortisol

Para a coleta de sangue, cinco peixes de cada tratamento foram submetidos à coleta de 3 mL de sangue por punção caudal, com o auxílio de seringas descartáveis, sendo 1 mL de sangue para análise da glicose plasmática e 2 mL para cortisol sérico. Para separação do plasma, a alíquota de 1 mL foi colocada em tubo contendo EDTA fluoretado, sendo então centrifugado durante 10 minutos a 2.500 rpm e coletado o sobrenadante, correspondente ao plasma. O soro foi obtido após submersão das amostras de sangue em banho-maria a 37°C por 10 minutos, seguida de centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos e coleta do sobrenadante (soro).

As análises de sangue foram feitas no Laboratório de Bioquímica Clínica, do Departamento de Análises Clínicas da UEM. Para avaliar os níveis de glicose plasmática, foi utilizado o teste Glucose GOD-FS (Diasys, Diagnostic Systems International, Alemanha), baseado na metodologia fotométrica enzimática, conforme instruções do fabricante. A análise da concentração de cortisol sérico foi feita a partir de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), utilizando o equipamento Architect 8200 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill, USA), com kit de reagentes da mesma marca.

## 2.5 Análises de pH, cor e perdas de água dos filés

Os indicadores de qualidade da carne avaliados foram pH, cor, capacidade de retenção de água (CRA), perda de água por pressão e perda de água por cozimento. As análises de pH, cor, perda de água por pressão e por cozimento foram realizadas nas amostras refrigerados, enquanto a CRA foi realizada a partir dos filés congelados.

O pH foi mensurado em triplicata por filé, em dez peixes por tratamento, 36

horas *post-mortem*, utilizando um potenciômetro digital portátil Toledo Mettler (modelo 1140, Mettler-Toledo, Woburn, MA), com eletrodo de inserção para carnes.

As medidas de luminosidade foram realizadas em dez peixes por tratamento, 36 horas *post-mortem*, na face ventral do filé tomando seis pontos diferentes de leitura por amostra. Os valores de luminosidade ( $L^*$ ) foram avaliados utilizando um colorímetro (MINOLTA modelo CR-10; Minolta Camera Co., Osaka, Japan), sob ângulo de 90°, a temperatura ambiente, em que  $L^*$  define a luminosidade ( $L^*= 0$  preto e  $L^*=100$  branco) e  $b^*$  (componente amarelo-azul).

A análise da capacidade de retenção de água (CRA) foi realizada em dez peixes por tratamento, conforme Lankhmanan et al. (2007). Foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AUY-220, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) amostras de 1 g de músculo cru em triplicata, colocadas em tubos de 1,5 mL munidos de papel filtro. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rcf (3.660 rpm) durante quatro minutos, a 4°C em centrífuga Eppendorf (modelo 5430R, Eppendorf North America, Inc., New York, USA). As amostras foram pesadas após a centrifugação e secas em uma estufa (modelo Orion 515, Fanem, São Paulo, Brasil) a 70°C por 12 horas. Passado esse período, as amostras secas foram novamente pesadas. Para cálculo da CRA foi utilizada a seguinte fórmula:

$$CRA\% = \frac{PAPC - PAS}{PAI} \times 100 \quad (1)$$

Onde PAI = Peso da amostra inicial; PAPC= Peso da amostra pós-centrifugação e PAS= Peso da amostra seca.

A perda de água por pressão foi realizada em triplicata, em cinco peixes por tratamento, conforme Barbut (1996). Para tanto, amostras de 0,5 g de músculo foram posicionadas entre dois papéis filtros qualitativo circulares de 5,5 cm de diâmetro, espessura de 205 µm e gramatura de 80 g/m<sup>2</sup>, colocadas entre duas placas



quadrangulares de vidro com espessura de 8 mm cada uma. Sobre este conjunto foi aplicada uma pressão uniforme, utilizando um peso de 10 kg por cinco minutos. Após, as amostras foram novamente pesadas e a diferença entre peso final e inicial foi expressa em porcentagem.

A mensuração da perda de água por cozimento foi realizada conforme Cason et al. (1997), em dez peixes por tratamento. Foram pesadas 70,0 g de músculo em balança semi-analítica (Marte BL320H, Marte Científica, São Paulo, Brasil), acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao cozimento em banho-maria (modelo NT 265, Novatecnica, São Paulo, Brasil) até a temperatura interna atingir 75 a 80°C, monitorada com termômetro digital. Após, as amostras foram resfriadas até 30°C, e pesadas novamente. A diferença entre o peso inicial e final foi expressa em porcentagem, correspondendo à perda de água por cozimento.

## 2.6 Análise sensorial

Para cada experimento foram utilizados dois testes (aceitação e intenção de compra). Os testes foram realizados conforme Dutcosky (2007) utilizando aleatoriamente 90 provadores não-treinados, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Pantanal (Corumbá-MS). O painel de julgadores foi composto por 43% de mulheres e 57% de homens, sendo que do total, 17% tinham idade de 17 a 26 anos, 13% de 27 a 36 anos, 33% de 37 a 46 anos, 23% de 47 a 56 anos e 14% de 57 a 60 anos.

Para avaliar a aceitação sensorial dos filés, os mesmos foram inicialmente descongelados sob refrigeração. A incorporação de sal se deu pela submersão dos filés por três minutos em salmoura a 10% de sal comum. Após, os filés isentos de aparas da filetagem foram cortados em cubos com cerca de 4 g e grelhados em *grill*

elétrico (Britânia Grill Mega, Brasil) com cerca de 2 ml de óleo de soja para cada 100 g de carne. Foi oferecido um cubo de filé de cada tratamento por provador, sendo que as diferentes amostras foram identificadas com três números aleatórios, utilizando material descartável, isento de odor estranho. Juntamente com a ficha de análise sensorial, foram oferecidos um copo contendo água e uma bolacha água e sal, e os julgadores foram orientados a comer um pedaço de bolacha e tomar água entre as amostras.

Os provadores foram questionados quanto à aparência, cor, maciez, suculência e sabor característico do pescado, utilizando escala hedônica estruturada de nove pontos, ancorada entre mínimo e máximo: desgostei extremamente (1) até gostei extremamente (9) (Dutcosky, 2007). Com estes dados foi calculado o Índice de Aceitabilidade (IA) dos produtos utilizando a fórmula abaixo:

$$IA\% = \frac{\text{nota média do produto}}{9} \times 100 \quad (2)$$

Além disso, os julgadores foram questionados quanto à intenção de compra com escala hedônica de cinco pontos com os extremos 1 (certamente não compraria) e 5 (certamente compraria), conforme Damásio e Silva (1996).

## 2.7 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises de glicose, cortisol e qualidade da carne foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento GLM do programa *Statistical Analysis System* (SAS, SAS Inst. Inc. Cary, NC, USA), e quando observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foi aplicado o teste de Tukey para comparação entre tratamentos.

Para realização da estatística das análises sensoriais, utilizou-se a metodologia dos modelos lineares generalizados (procedimento GENMOD do SAS), considerando

a distribuição gamma para as variáveis cor, maciez, suculência, sabor característico do pescado e intenção de compra; e distribuição normal para índice de aceitação.

Para estas análises foram propostos os contrastes:

$$C = \mu_{60 \text{ min}} + \mu_{240 \text{ min}} - 2\mu_{\text{controle.}} \text{ (análise sensorial 1)}$$

$$C = \mu_{100 \text{ kg/m}^3} + \mu_{400 \text{ kg/m}^3} - 2\mu_{\text{controle.}} \text{ (análise sensorial 2)}$$

Os contrastes foram testados pelo teste T a 5% de significância.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Experimento 1 – Tilápias-do-Nilo submetidas a diferentes tempos de transporte

Os níveis de cortisol sérico e glicose plasmática foram significativamente diferentes entre os tempos 60 e 240 minutos de transporte (Figura 1), sendo que no tempo 60 min, as tilápias apresentaram maior concentração de cortisol ( $P= 0,0186$ ) e de glicose ( $P= 0,0031$ ). Em 240 min de transporte, os níveis de cortisol e glicose foram semelhantes ao do tratamento controle.

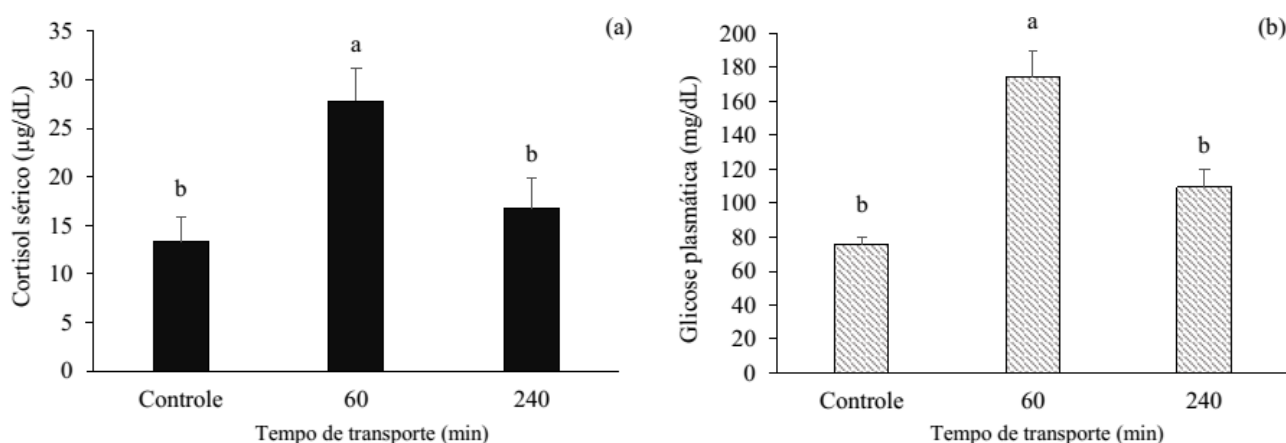


Figura 1. Cortisol sérico (a) e glicose plasmática (b) de tilápias-do-Nilo submetidas ao transporte na densidade de  $200 \text{ kg/m}^3$  em tempos de 60 e 240 minutos de transporte. Letras diferentes mostram diferença significativa entre tratamentos pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Linhas verticais representam o erro padrão da média ( $n=5$ ).

Nos atributos de qualidade dos filés avaliados (Tabela 1), não foi observada diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para os parâmetros pH, luminosidade ( $L^*$ ), croma  $b^*$  e perda de água por cozimento.

Tabela 1. Características de qualidade de filés de tilápias-do-Nilo submetidas ao transporte na densidade de 200 kg/m<sup>3</sup> em tempos de 60 e 240 minutos de transporte.

Parâmetros	Controle	Tempo de transporte		P
		60 min	240 min	
pH	5,85±0,12	6,00±0,08	6,11±0,06	0,1781
$L^*$	45,08±0,51	44,99±0,35	43,87±0,42	0,1080
$b^*$	8,16±0,21	7,96±0,29	7,55±0,23	0,2178
Perda de água por cozimento (%)	22,91±0,79	22,37±1,01	20,90±0,91	0,2831

Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (n=10).  $L^*$ =luminosidade (0 preto e 100 branco),  $b^*$  (componente amarelo-azul).

Porém, quando avaliados os parâmetros de capacidade de retenção de água (CRA) e perda de água por pressão, pode-se observar que 60 minutos de transporte proporcionou filés com menor CRA ( $P=0,0067$ ) e maior perda de água por pressão ( $P=0,0005$ ) (Figura 2). Quando transportados por 240 min, os peixes desenvolveram filés com maior CRA (59,64%) e menor perda de água por pressão (29,63%). Os tempos 60 e 240 não diferiram do tratamento controle para estes parâmetros.

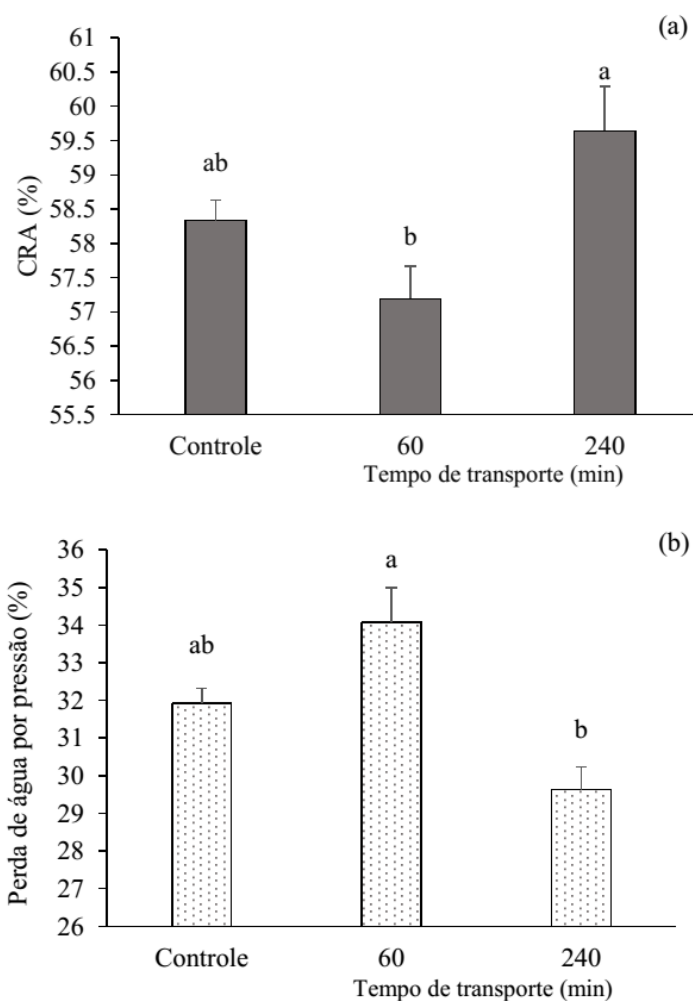


Figura 2. Capacidade de retenção de água (CRA) (a) e perda de água por pressão (b) em filés de tilápias-do-Nilo submetidas ao transporte na densidade de 200 kg/m<sup>3</sup> em tempos de 60 e 240 minutos de transporte. Letras diferentes mostram diferença significativa entre tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Linhas verticais representam o erro padrão da média ( $n=10$  para CRA e  $n=5$  para perda de água por pressão).

Na análise sensorial, pode-se observar que não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para as características de cor, maciez, sabor característico do pescado, índice de aceitação e intenção de compra (Tabela 2). Porém quando avaliado o item suculência, filés dos peixes submetidos ao transporte por 240 min apresentaram escore maior (7,25) em relação aos peixes do controle (6,90).

Tabela 2. Atributos sensoriais<sup>1</sup>, índice de aceitação e intenção de compra<sup>2</sup> de filés de tilápias-do-Nilo submetidas ao transporte na densidade de 200 kg/m<sup>3</sup> em tempos de 60 e 240 minutos de transporte.

Atributos	Controle	Tempo de transporte		Contraste
		60 min	240 min	
Cor	7,02±0,15	7,30±0,15	7,11±0,15	0,2331
Maciez	7,38±0,13	7,34±0,15	7,51±0,14	0,4432
Suculência	6,90±0,15 b	7,02±0,15 ab	7,25±0,14 a	0,0447
Sabor característico de pescado	7,08±0,16	7,03±0,17	7,14±0,15	0,8902
Índice de aceitação (%)	78,95±1,26	79,94±1,39	80,68±1,24	0,2715
Intenção de compra	4,10±0,13	4,18±0,11	4,00±0,11	0,4239

<sup>1</sup>Escala hedônica entre 1 (desgostei extremamente) e 9 (gostei extremamente); <sup>2</sup>Escala hedônica entre 1 (certamente não compraria) e 5 (certamente compraria). Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste T. Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=90).

### 3.2 Experimento 2 – Tilápias-do-Nilo submetidas a diferentes densidades de transporte

Os peixes submetidos a duas densidades de transporte (100 e 400 kg/m<sup>3</sup>), após 180 minutos, não apresentaram diferença (P= 0,5186) para os níveis séricos de cortisol, e também não houve diferença entre as densidades e o tratamento controle (Figura 3). Na glicose plasmática, verificou-se que as densidades 100 e 400 kg/m<sup>3</sup> apresentaram médias semelhantes, porém maiores do que a média do controle (P=0,0149) (Figura 3).

Nas características de qualidade, o pH apresentou diferença entre os tratamentos, sendo que a densidade 400 kg/m<sup>3</sup> proporcionou filés com maior pH (6,20) comparado ao tratamento controle (5,85) (Tabela 3). A média de pH dos filés da densidade 100 kg/m<sup>3</sup> foi semelhante às demais (6,04). Não foi observada diferença (P>0,05) entre os tratamentos para luminosidade (L\*), croma b\*, capacidade de retenção de água, perda de água por pressão e por cozimento (Tabela 3).

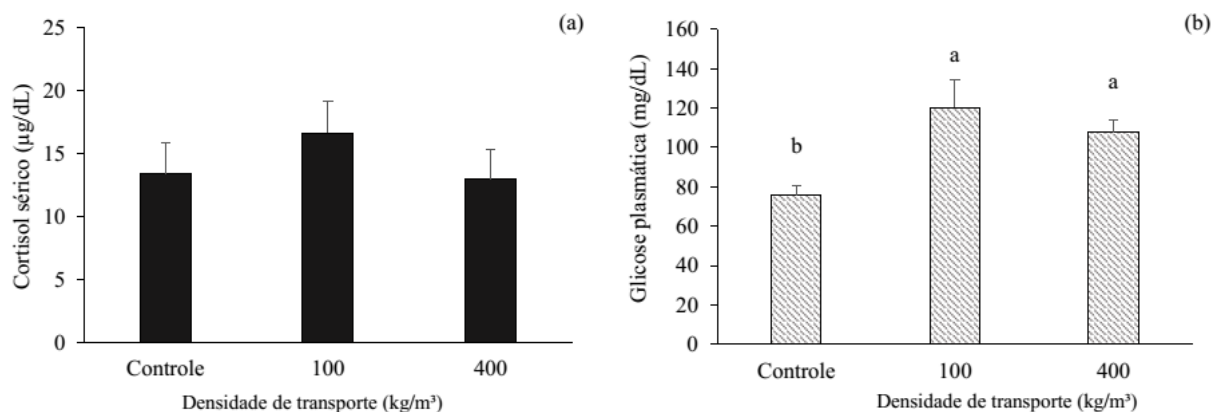


Figura 3. Cortisol sérico (a) e glicose plasmática (b) de tilápias-do-Nilo submetidas ao transporte por 180 minutos nas densidades de transporte de 100 e 400 kg/m<sup>3</sup>. Letras diferentes mostram diferença significativa entre tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05). Linhas verticais representam o erro padrão da média (n=5).

Tabela 3. Características de qualidade de filés de tilápia submetidas ao transporte por 180 minutos nas densidades 100 e 400 kg/m<sup>3</sup>.

Parâmetros	Controle	Densidade de transporte		P
		100 kg/m <sup>3</sup>	400 kg/m <sup>3</sup>	
pH	5,85±0,12 b	6,04±0,08 ab	6,20±0,06 a	0,0458
L*	45,08±0,51	43,90±0,45	45,32±0,65	0,1587
b*	8,16±0,21	7,57±0,25	7,83±0,32	0,3040
Capacidade de retenção de água (%)	58,33±0,30	58,93±0,41	59,10±0,38	0,3134
Perda de água por pressão (%)	31,92±0,40	30,16±1,06	31,76±0,77	0,2526
Perda de água por cozimento (%)	22,91±0,79	21,39±1,09	20,80±1,20	0,3493

Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=10). L\*=luminosidade (0 preto e 100 branco), b\* (componente amarelo-azul).

Na avaliação sensorial dos filés, não foi observada diferença (P>0,05) para os parâmetros maciez, suculência, sabor característico de pescado e intenção de compra (Tabela 4). Porém, a cor dos filés submetidos ao transporte na densidade de 400 kg/m<sup>3</sup> apresentou score superior (7,39) quando comparado aos filés do tratamento controle (7,02) (P=0,0353). Em decorrência disto, o índice de aceitação para filés da densidade 400 kg/m<sup>3</sup> também foi maior em relação aos demais tratamentos (81,45%) (P=0,0237).

Tabela 4. Atributos sensoriais<sup>1</sup>, índice de aceitação e intenção de compra<sup>2</sup> de filés de tilápia submetidas ao transporte por 180 minutos nas densidades de transporte de 100 e 400 kg/m<sup>3</sup>.

Atributos	Controle	Densidade de transporte		Contraste
		100 kg/m <sup>3</sup>	400 kg/m <sup>3</sup>	
Cor	7,02±0,15 b	7,15±0,16 ab	7,39±0,14 a	0,0353
Maciez	7,38±0,13	7,38±0,16	7,53±0,14	0,5108
Suculência	6,90±0,15	6,90±0,15	7,17±0,14	0,1558
Sabor característico de pescado	7,08±0,16	6,92±0,16	7,19±0,16	0,4142
Índice de aceitação (%)	78,95±1,26 b	78,96±1,45 b	81,45±1,29 a	0,0237
Intenção de compra	4,10±0,13	3,98±0,11	4,21±0,10	0,1963

<sup>1</sup>Escala hedônica entre 1 e 9; <sup>2</sup>Escala hedônica entre 1 e 5. Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste T. Dados expressos em média ± erro padrão da média (n=90).

#### 4 DISCUSSÃO

A alteração no nível sanguíneo de cortisol é considerada como uma resposta primária do organismo ao estresse, sendo a glicose, lactato e pH normalmente indicadores secundários de estresse (Ellis et al., 2012; Hultmann et al., 2012). No presente estudo, observou-se que o transporte por 60 minutos acarretou em maior nível de cortisol sérico e glicose plasmática, sendo que os níveis encontrados no tratamento controle destes metabólitos foram reestabelecidos nos 240 minutos de transporte (Figura 1), evidenciando uma adaptação fisiológica dos animais à situação de estresse. Verificou-se que as diferentes densidades de transporte (100 e 400 kg/m<sup>3</sup>) não afetaram os níveis de cortisol e glicose, porém as concentrações de glicose dos peixes nestas densidades foram superiores ao do tratamento controle (Figura 3). Apesar de não haver diferença no indicador primário de estresse (cortisol) para as diferentes densidades, a hiperglicemia observada é uma resposta corporal ao estresse sofrido, pois os glicocorticóides, corticosteróides e catecolaminas fazem elevar o nível de açúcar do sangue (Tejpal et al., 2009), resposta aliada também à liberação de glicose hepática, o principal carboidrato de reserva do peixe (Lima et al.,



2006).

Dos parâmetros de qualidade da carne avaliados no presente estudo, pode-se observar a influência do estresse sobre a capacidade de retenção de água (CRA) e sobre a perda de água por pressão (Figura 2). Os peixes mais estressados (transportados por 60 minutos na densidade 200 kg/m<sup>3</sup>) apresentaram menor CRA e maior perda de água por pressão, em relação aos peixes transportados por 240 minutos.

Diversos estudos têm relacionado o estresse pré-abate com diminuição da CRA em peixes (Bjrnevik e Solbakken, 2010; Digre et al., 2011; Hultmann et al., 2012). Os fatores que influenciam a CRA são a concentração de ácido láctico, inosina monofosfato, de trifosfato de adenosina (ATP), glicogênio e inosina, além do pH e da temperatura do músculo (Schäfer et al. 2002). Lund et al. (2011) relatam que a capacidade do músculo reter água é afetada por vários fatores, como pH, oxidação das proteínas pós-morte, atividade proteolítica das enzimas do amaciamento da carne, e ligação cruzada das proteínas miofibrilares. Especialmente, a CRA é conhecida por ser afetada pelo pH, pois o pH próximo do ponto isoelétrico das proteínas diminui a CRA (Huff-Lonergan e Lonergan, 2005). Porém, no presente estudo não foi possível relacionar as alterações da CRA com o pH do músculo, visto que não houve diferença neste parâmetro para os diferentes tempos de transporte (60 e 240 min) (Tabela 1). Possivelmente, a velocidade de queda do pH logo após o abate influencia mais na CRA do que o pH final, motivo pelo qual não foram observadas diferenças no pH 36 horas *post-mortem*.

Alterações no pH foram observadas nos peixes submetidos a diferentes densidades de transporte, onde a maior densidade acarretou em maior pH (6,20) em relação ao tratamento controle (5,85) (Tabela 3). O abate logo após a despesca pode

ter ocasionado em um consumo mais rápido do glicogênio com aumento da taxa de respiração anaeróbia, acarretando em maior produção do ácido láctico e abaixamento do pH da carne, em relação aos peixes das duas densidades (100 e 400 kg/m<sup>3</sup>), que haviam sido transportados por 180 minutos e possivelmente tiveram tempo para recuperação das taxas de glicogênio. Porém, estas alterações no pH não foram capazes de influenciar os demais parâmetros de qualidade do filé (Tabela 3).

As maiores perdas de água observadas nos filés de peixes mais estressados do presente estudo afetaram a suculência dos filés, conforme sugerido por Huff-Lonergan e Lonergan (2005). Na análise sensorial, os filés provenientes do transporte por 240 minutos, que possuíam maior CRA e menor perda de água por pressão, apresentaram melhor escore para o atributo suculência. Para o consumidor, a capacidade de retenção de água traduz a sensação de suculência no momento da mastigação (Silva et al., 2008), afirmação corroborada pelos dados do presente estudo.

Apesar da ausência de diferenças na luminosidade (L\*) e croma b\* dos filés transportados em diferentes densidades (100 e 400 kg/m<sup>3</sup>), peixes transportados em 400 kg/m<sup>3</sup> apresentaram melhor nota para o atributo cor e maior índice de aceitação sensorial (Tabela 4). Todavia, quando foram agrupados todos os peixes da densidade 400 kg/m<sup>3</sup>, nos quatro tempos de transporte (Goes et al., 2015), foi observada uma maior média (P=0,0359) para o croma b\* na densidade de 400 kg/m<sup>3</sup> (8,05), em relação às densidades 100 e 200 kg/m<sup>3</sup> (7,63 e 7,64, respectivamente). Estes resultados indicam que peixes transportados em 400 kg/m<sup>3</sup> possuíam carne com cor amarela mais intensa, e esta alteração possivelmente levou à uma melhor aceitação visual destes filés pelos provadores. O fato dos provadores preferirem filés com cor amarela mais intensa pode estar relacionado com preferências regionais, visto que a

análise sensorial foi conduzida com voluntários da cidade de Corumbá (MS), região do Pantanal, onde a maior parte dos peixes consumidos provém da pesca.

A avaliação sensorial de filés de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) demonstrou que peixes abatidos com uso do anestésico AQUI -S™ apresentaram cor da superfície mais brilhante do que filés expostos ao estresse pré-abate, porém os provadores não perceberam diferenças em relação ao odor, sabor e textura (Digre et al., 2011). Porém, diferenças na textura do filé de bacalhau abatido com e sem estresse *ante-mortem* foram observadas por provadores treinados (Sveinsdóttir et al., 2010).

Os atributos sensoriais avaliados em ambas as análises sensoriais apresentaram valores entre 6,90 e 7,53 para as características de cor, maciez, suculência e sabor característico do pescado. Considerando que na escala hedônica os valores 6 e 8 correspondem a “gostei ligeiramente” e “gostei muito”, respectivamente, pode-se observar a boa aceitação da tilápia-do-Nilo pelos julgadores, fato corroborado pelos índices de aceitação acima de 70% (Dutcosky, 2007 recomenda índice de aceitação mínima de 70% para que o produto seja bem aceito). Além disso, os valores obtidos para o fator intenção de compra foram a partir de 3,98; indicando que os provadores provavelmente comprariam os filés de tilápia-do-Nilo, visto que o escore 4 representava a escolha “possivelmente compraria”.

## 5 CONCLUSÕES

Peixes com menor nível de cortisol sérico e glicose plasmática (submetidos a 240 min de transporte e 200 kg/m<sup>3</sup>) desenvolveram carne com maior capacidade de retenção de água, menor perda de água por pressão e melhor suculência, em relação a peixes com maiores níveis de cortisol sérico e glicose plasmática (submetidos a 60 minutos

de transporte e 200 kg/m<sup>3</sup>). As densidades de transporte 100 e 400 kg/m<sup>3</sup>, após 180 minutos de transporte, não afetaram os indicadores de estresse e parâmetros de qualidade instrumental dos filés, porém peixes transportados em 400 kg/m<sup>3</sup> apresentaram melhor aceitação visual pelos provadores.

## 6 REFERÊNCIAS

- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Østbye, T. K., Veiseth-Kent, E., Thomassen, M. S., Ofstad, R. 2010. 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 Chem.*, 118(3), 602-615.
- Barbut, S. 1996. Estimates and detection of the PSE problem in young turkey breast meat. *Can J Anim Sci*, 76(3): 455-457.
- Bjørnevik, M., Solbakken, V. 2010. Pre-slaughter stress and subsequent effect on flesh quality in farmed cod. *Aquaculture Research*, 41(10), e467-e474.
- Cason, J. A., Lyon, C. E., Papa, C. M. 1997. Effect of muscle opposition during rigor on development of broiler breast meat tenderness. *Poult Sci.* 76, 725 – 787.
- Damásio MH, Silva MAAP. 1996 Curso de treinamento em análise sensorial. Apostila. Campinas: Fundação Tropical de Tecnologia "André Tosello".
- Digre, H., Erikson, U., Skaret, J., Lea, P., Gallart-Jornet, L., Misimi, E. 2011. Biochemical, physical and sensory quality of ice-stored Atlantic cod (*Gadus morhua*) as affected by pre-slaughter stress, percussion stunning and AQUI-S™ anaesthesia. *Eur. Food. Res. Technol.*, 233, 447-456.
- Dutcosky, S. D. 2007. Análise sensorial de alimentos, 2 ed. Champagnat, Curitiba.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C. I. 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol. Biochem.* 38(1), 163-188.

- FAO. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma.
- Goes E.S.R., Lara JAF, Gasparino E, Del Vesco AP, Goes MD, Alexandre Filho L, Ribeiro, R.P. (2015). Pre-slaughter stress affects ryanodine receptor protein gene expression and the water-holding capacity in fillets of the Nile tilapia. PLoS ONE 10(6): e0129145.
- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S. M., 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. Meat Sci. 71, 194–204.
- Hultmann, L., Phu, T. M., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., Rustad, T. 2012. Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). Food chem., 134(3), 1399-1408.
- Jørpeland, G., Imsland, A., Stien, L. H., Bleie, H., Roth, B. 2013. Effects of filleting method, stress, storage and season on the quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Aquacult. Res., 1-11.
- Lankhmanan, R., Parkinson, J.A.; Piggott, J.R. 2007. High-pressure processing and water holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*). LWT-Lebensm. Wiss. Technol., 40(3):544-551.
- Lima, L. C., Ribeiro, L. P., Leite, R. C., Melo, D. C. 2006. Estresse em peixes. Rev Bras Reprod Anim, 30, 113-117.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., Estévez, M. 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. Mol Nutr Food Res. 55, 83–95.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2011. Brasília, 2013.

- Olsson, G. B., Olsen, R. L., Ofstad, R. 2003. Post-mortem structural characteristics and water-holding capacity in Atlantic halibut muscle. *LWT- Food Sci. Technol.* 36(1), 125-133.
- Rahmanifarah, K., Shabanpour, B., Sattari, A. 2011. Effects of clove oil on behavior and flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in comparison with pre-slaughter CO<sub>2</sub> stunning, chilling and asphyxia. *Turk J Fish Aqua Sci.* 11, 139-147.
- Roth, B., Slinde, E., Arildsen, J. 2006. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. *Aquaculture*, 257, 504–510.
- Roth, B., Grimsbø, E., Slinde, E., Foss, A., Stien, L. H., Nortvedt, R. 2012. Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and rigor mortis. *Aquaculture*, 326, 178-180.
- Schäfer, A., Rosenvold, K., Purslow, P. P., Andersen, H. J., Henckel, P. 2002. Physiological and structural events post mortem of importance for drip loss in pork. *Meat Sci.*, 61(4), 355–366
- Sveinsdóttir K., Martinsdóttir E., Thórsdóttir F., Schelvis R., Kole A., Thórsdóttir I. 2010. Evaluation of farmed cod products by a trained sensory panel and consumers in different test settings. *J. Sens. Stud.* 25, 280–293.
- Silva, N.V., Silva, J.H.V., Coelho, M.S, Oliveira, E.R.A., Araújo, J.A., Amancio, A.L.L. 2008. Características de carcaça e carne ovina: Uma abordagem das variáveis metodológicas e fatores de influência. *Acta Vet. Brasilica.* 2, 4-110.
- Stien, L. H., Hirmas, E., Bjørnevik, M., Karlsen, Ø., Nortvedt, R., Rørå, A. M. B., Sunde, J., Kiessling, A. 2005. The effects of stress and storage temperature on the colour and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.* 36, 1197–1206.

Tavares, M., Gonçalves, A.A. Aspectos físico-químicos do pescado. IN: Gonçalves, A.A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011. 608p.

Tejpal, C. S., Pal, A. K., Sahu, N. P., Kumar, J. A., Muthappa, N. A., Vidya, S., Rajan, M. G. 2009. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Aquaculture*, 293, 272–277.