

AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM TILÁPIA DO NILO APÓS A INSENSIBILIZAÇÃO POR ELETRONARCOSE

Adriana Cristina BORDIGNON^{1*}; Paulo Roberto Campagnoli OLIVEIRA FILHO²; Júlio César Carvalho BALIEIRO³ & Elisabete Maria Macedo VIEGAS⁴

^{1*} Centro de Ciências Humanas, Naturais, Saúde e Tecnologia. Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Estrada de Pacas Km 10, s/n - Bairro Enseada. CEP 65200-000 - Pinheiro, MA

² Departamento de Pesca e Aquicultura. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos – CEP: 52171-900 – Recife, PE

³ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). Avenida Duque de Caxias Norte, 225. Campus Fernando Costa - USP. CEP: 13635-900 - Pirassununga, SP

⁴ Departamento de Zootecnia. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – (FZEA/USP). Avenida Duque de Caxias Norte, 225. Campus Fernando Costa/ Pirassununga. CEP: 13635-900 – Pirassununga, SP

*email: adriana.bordignon@hotmail.com

Recebido em 20/04/2017

Resumo - Diversos métodos de insensibilização expõem os peixes a dores e sofrimentos desnecessários. A eletronarcose é uma técnica rápida e aparentemente causa menos sofrimento aos peixes, portanto pode garantir condições de bem-estar durante o abate. Entretanto, as variáveis do equipamento e as condições da aplicação da energia devem ser ajustadas para evitar danos indesejáveis na carcaça. O objetivo deste estudo foi avaliar a eletronarcose como método de insensibilização, utilizando diferentes voltagens e tempos de exposição, totalizando sete tratamentos (100V/20s; 100V/40s; 100V/60s; 200V/20s; 200V/40s; 200V/60s e um tratamento controle, com anestésico). Testes comportamentais foram realizados para avaliar a insensibilização dos peixes. Posteriormente, a qualidade da carne foi avaliada sensorialmente e também por determinação da cor instrumental. Os testes comportamentais indicaram que as melhores combinações de corrente elétrica e tempo de exposição, foram de 100 e 200 volts durante 60s. A ausência dos parâmetros de respiração e rotação dos olhos mostrou que os peixes ficaram insensibilizados, pois apresentaram escores próximos de zero para os tratamentos 100V / 60s, 200V / 40s e 200V / 60s. O teste de ordenação mostrou que a intensidade hemorrágica nos filés, coloração vermelha, foi mais intensa para os filés do tratamento de 200V/60s. O tempo considerado mais seguro para realizar o abate, no qual a maioria dos parâmetros comportamentais avaliados estava ausente, foi de até 1 min após a insensibilização. O tratamento que garantiu condições de bem-estar aos peixes e proporcionou aos filés menores intensidades da coloração vermelha foi 100V/60s.

Palavras-Chave: *Oreochromis niloticus*, Abate humanitário, Filés

ASSESSMENT OF BEHAVIORAL PARAMETERS IN NILE TILAPIA AFTER ELECTRICAL STUNNING

Abstract - Several stunning methods expose fish to pain and unnecessary suffering. The electronarcosis is a quick technique and apparently causes less suffering to fish, thus, it can ensure welfare conditions during slaughter. However, it is necessary to adjust the variables of the electrical equipment and the application conditions to avoid unwanted damage to the carcass. The aim of this study was to evaluate the electronarcosis as stunning method using different voltages and exposure times, a total of seven treatments (100V/20s; 100V/40s; 100V/60s; 200V/20s; 200V/40s; 200V/60s, and anesthetic as control). The fish stunning was assessed using behavioral tests. The meat quality was evaluated by sensory analysis and instrumental color. Behavioral tests indicated, the best combinations of electrical current and exposure time were 100 and 200 volts for

60 seconds. The absence of the parameters eye rotation and breathing showed that fish were stunned, since had scores close to zero for the treatments 100V/60s, 200V/40s and 200V/60s. The sorting test showed that the bleeding intensity in fillets, red coloration, was more intense for the fillets of the treatment of 200V/60s. The time considered safer to perform the slaughtering, in which most of the evaluated behavioral parameters were absent, was up to 1 min after stunning. The treatment which ensured welfare conditions for fish and provided the lower intensities of red color of fillets was 100V / 60s.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, Humanitarian slaughter, Fillet

INTRODUÇÃO

Os princípios de bem-estar estudados para aves e mamíferos também podem ser aplicados aos peixes. O manejo adequado aliado a um sistema de gestão que possa minimizar as ameaças do bem-estar dos peixes precisa ser aplicado em fazendas de cultivo como estratégia para atenuar os efeitos causados durante etapas de produção (HUNTINGFORD & KADRI, 2014).

A aplicação de métodos considerados humanitários se baseia no princípio de que as etapas de manejo pré-abate e abate, sejam executadas rapidamente para evitar o medo, a dor ou os sofrimentos desnecessários no momento da morte dos peixes (RAHMANIFARAH, SHABANPOUR & SATTARI, 2011). Muitos métodos utilizados pelas indústrias para insensibilizar e abater os peixes, como asfixia no ar ou com gelo, choque térmico, narcose com gases e imersão em sal, são considerados estressantes e podem influenciar, negativamente, na qualidade da carne (VIEGAS et al., 2012).

Um método de abate é considerado humanitário, quando este é baseado no princípio de insensibilizar, instantaneamente, os animais em que ocorre a perda imediata e completa da atividade cerebral. A rapidez com que o método escolhido insensibilize o peixe é que vai demonstrar se este é ou não considerado um método humanitário (POLI, 2009).

A eletronarcose é um método de insensibilização considerada humanitária por ser rápida e causar, aparentemente, menos sofrimento em relação às demais técnicas (NORDGREEN, SLINDE, MOLLER & ROTH, 2008). Apresenta grande vantagem pela manipulação conjunta de grandes lotes de peixes, podendo ser realizada dentro da água ou aplicada diretamente na cabeça (EFSA, 2009). Entretanto, necessita de maiores estudos para ser bem executada, porque não existem padrões pré-determinados para as variáveis de voltagem, de intensidade da corrente e de tempo de exposição para cada espécie de peixe (NORDGREEN, SLINDE, MOLLER & ROTH, 2008). O estudo destas variáveis é importante na prevenção de alguns efeitos indesejáveis no músculo, como a ruptura de ossos e hemorragias que podem ocorrer durante a prática de insensibilização (KNOWLES et al., 2008).

Para avaliar se um método de insensibilização está sendo eficiente e está garantindo o bem-estar dos peixes são utilizadas algumas observações comportamentais, que têm sido amplamente aplicadas em mamíferos e aves (ERASMUS, TURNER & WIDOWSKI, 2010). O nível de consciência e da função cerebral são observados, robustamente, durante procedimentos de pré-abate e abate. Alguns estudos demonstram que avaliar o comportamento auto-iniciado dos peixes, como: força e a persistência da motilidade de natação, movimento das brânquias, capacidade de manter o

equilíbrio, quando o peixe é virado de cabeça para baixo, movimento dos olhos, seguido por rotação do peixe no eixo longitudinal e reação à punção com agulha passada da cabeça até a cauda, pode fornecer uma estimativa do estresse sofrido pelo animal durante a insensibilização (POLI, 2009).

Alguns dos reflexos controlados por nervos craniais no tronco encefálico, como reflexo da córnea e a respiração rítmica, são largamente utilizados para avaliar o estado de insensibilização em aves. (ERASMUS, TURNER & WIDOWSKI, 2010). Os mesmos parâmetros podem ser utilizados para avaliar o nível de inconsciência nos peixes. Esses dois reflexos são os últimos sinais a serem perdidos durante práticas de insensibilização e os primeiros a serem recuperados após a insensibilização. Portanto, se houver a ausência da atividade cerebral em resposta aos estímulos observados há indícios de que o animal está insensibilizado (GREGORY & WOTTON, 1983).

O objetivo deste estudo foi aplicar a eletronarcese, como método de insensibilização em tilápia do Nilo, testando diferentes voltagens e tempos de exposição, para avaliar por meio dos parâmetros comportamentais a insensibilização dos peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 63 exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com peso médio de 629,2g e comprimento médio de 29,72cm, adquiridos em uma piscicultura comercial na cidade de Pirassununga/SP. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Foram alojados em dois tanques de alvenaria com capacidade de 5000L de água e renovação constante, nos quais permaneceram em jejum por 48h antes dos testes. A insensibilização foi realizada em uma caixa plástica de 120L, com temperatura da água a 27,5°C, pH 5,79, oxigênio dissolvido 4,76mg/L, salinidade 0,03%. A condutividade elétrica foi pré-ajustada em 700 μ S, utilizou-se corrente alternada (AC) e frequência de 60Hz. Os parâmetros de qualidade da água foram verificados antes e após os testes, com o auxílio da sonda multiparâmetro. Foram testados seis tratamentos de insensibilização utilizando a eletronarcese: 100V/20s, 100V/40s, 100V/60s, 200V/20s, 200V/40s, 200V/60s e um tratamento controle, com a benzocaína, administrada na proporção de 1g para 10L de água, dissolvida em álcool 70% e misturada em uma caixa com capacidade de 120L de água. Para cada tratamento foram utilizados nove peixes, distribuídos em lotes de três animais. Após a insensibilização, cada peixe foi transferido para uma caixa plástica com 120L de água, na qual foram avaliados os parâmetros comportamentais de natação e equilíbrio, manipulação e picada, movimento opercular e rotação dos olhos. Para cada atributo foi dado um escore de 0 a 2, em que: 0 ausência total reflexos; 1 reflexos parciais e 2 reflexos normais, de acordo com a metodologia proposta por Kestin, Van de vis &

Robb (2002). A avaliação foi realizada por três pessoas treinadas em intervalos de 1 minuto durante 10 min. Ao término de cada teste, a maioria dos peixes já havia retomado parte dos seus reflexos e foram insensibilizados por solução de água e gelo (1:1) até a perda total dos reflexos e, posteriormente, realizou-se a sangria com corte dos arcos branquiais, como método de abate. Na sequência, os peixes foram pesados, medidos e filetados. Os filés foram submetidos ao teste sensorial de ordenação (ABNT, 1994), no qual foi apresentado a nove julgadores treinados para este tipo de avaliação, seis bandejas com seis amostras em cada uma, codificadas com 4 dígitos, solicitando a ordenação crescente de acordo com o atributo hemorragia no filé. A análise estatística do teste de ordenação foi realizada pelo teste de Friedman. Os dados obtidos foram avaliados pela Tabela de Newell & Mac Farlane (1987), ao nível de 5 % de significância. As amostras que apresentaram uma diferença igual ou maior que 27, entre a somatória dos resultados, apresentam diferença ($p < 0,05$) entre si. Os filés também foram submetidos à análise de cor instrumental utilizando um colorímetro portátil, foram usados os parâmetros de cor L^* (luminosidade), a^* (intensidade vermelho) e b^* (intensidade amarelo) (CIE, 1978). Para cada filé foram realizadas três medidas na região acima da linha lateral. Para a análise comportamental, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial de 6 parâmetros (natação, manipulação, movimento opercular, rotação dos olhos, picada e equilíbrio) em 11 tempos observados (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), e 3 repetições por tratamento. Quando verificado efeito significativo nas médias de comportamento e cor instrumental, aplicou-se o teste de Tukey em nível de 5% de significância, com o programa (SAS, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a aplicação da eletronarcose, os peixes apresentaram imobilidade instantânea ocorrida em função da perda imediata dos reflexos durante a geração do campo elétrico. Na avaliação comportamental, notou-se que alguns animais apresentaram espasmos musculares, de forma esporádica, ao longo do corpo e a maioria dos peixes já iniciava uma lenta recuperação dos movimentos operculares.

A avaliação dos parâmetros comportamentais, apresentado (Tabela 1), mostra que maior número de animais totalmente ou parcialmente insensibilizados foi nos tempos entre (t_0) e (t_1) min, próximos do escore 0 tornando-se mais evidente nos tratamentos 100V/60s, 200V/40s e 200V/60s. Estudos com o bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), utilizando a aplicação de corrente alternada (AC) e corrente direta (DC) acopladas, com tempo de exposição de 0,5 s e intensidade da corrente de 107 V demonstrou que os reflexos visuais se mantiveram ausentes por um tempo médio de 3s

após a exposição do peixe a eletronarcese. Esses parâmetros foram eficientes para insensibilizar o animal, instantaneamente, entretanto, a exposição por mais de 15s prolongou o estado de inconsciência, facilitando a abate imediato, sem que houvesse a recuperação dos sentidos (Erikson et al., 2012).

Tabela 1. Avaliação dos parâmetros de natação, equilíbrio, manipulação, picada, rotação dos olhos e movimento opercular em tilápia do Nilo.

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

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

A insensibilização do bacalhau saithe (*Pollachius virens*) com 40V e 70V por 6s resultou na recuperação dos reflexos visuais mais rápido do que quando testado 100V por 6s. Portanto, a utilização de maiores voltagens e mesmo tempo de exposição resultou em uma retomada mais lenta dos reflexos (ERIKSON, DIGRE & GRIMSMO, 2016)

Foi possível observar na Figura 1, por meio dos parâmetros de rotação dos olhos e movimento opercular, que tempos de exposição mais prolongados ao campo elétrico têm maior eficácia em garantir a insensibilização de um número maior de peixes. Por meio da rotação dos olhos e do batimento opercular foi possível notar que os tratamentos, que apresentaram escores próximos a zero, nos tempos entre 0 e 1 min foram 100V/60s, 200V/40s e 200V/60s. Se a rotação dos olhos e a

respiração estiverem ausentes, é seguro afirmar que o peixe está insensibilizado (Kestin, Van de vis & Robb, 2002).

Na maioria dos tratamentos foi possível observar que quando reiniciou o batimento opercular de forma lenta, paralelamente, ocorreu o reflexo da córnea em um ou nos dois olhos do peixe, portanto, o retorno desses dois reflexos foi verificado de forma simultânea. Na sequência, foi observado o retorno do reflexo de picada, na medida em que a agulha era passada ao longo da linha lateral do corpo, observava-se que os peixes eriçavam as nadadeiras, e quando eram postos na água de cabeça para baixo já havia um pequeno reflexo para retomar o seu equilíbrio. A avaliação dos reflexos do vestibulo ocular, natação, respiração e equilíbrio no bacalhau saithe (*Pollachius virens*), logo após a insensibilização com eletronarcose, mostrou que os peixes apresentaram ausência de todos os reflexos, portanto estavam inconscientes e insensibilizados (ERIKSON, DIGRE & GRIMSMO, 2016). De acordo com Kestin, Van de vis & Robb (2002), utilizando esses parâmetros comportamentais é possível avaliar um grande número de peixes e verificar a eficiência do método de insensibilização.

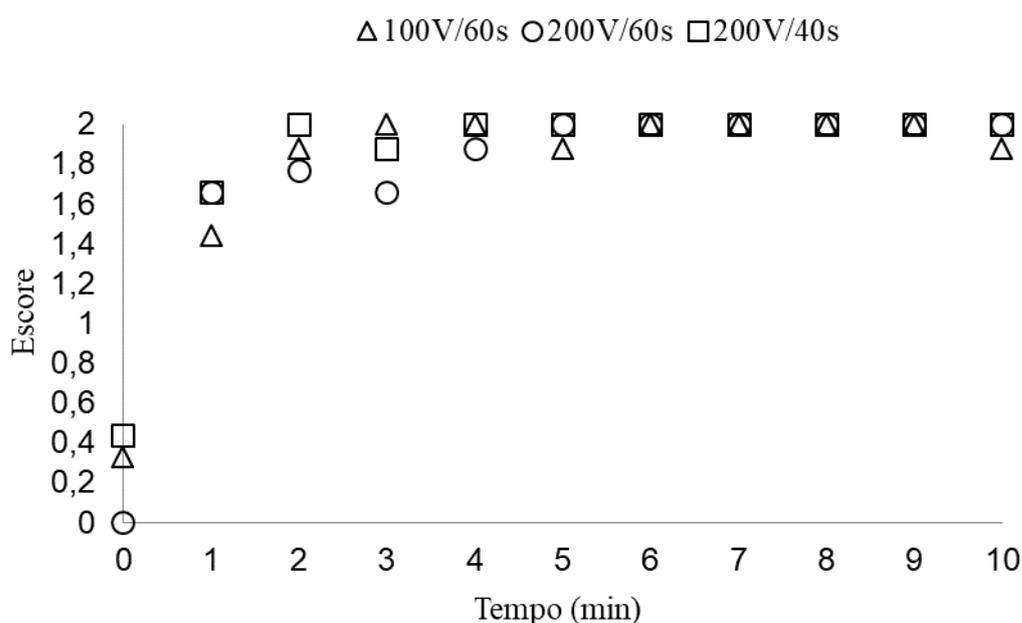


Figura 1. Recuperação do movimento opercular e rotação dos olhos em tilápia do Nilo, utilizando diferentes voltagens.

No teste de ordenação, a maioria dos avaliadores classificou a voltagem 200V/60s, como sendo a responsável por causar um aumento de hemorragias nos filés, sendo notada pela presença da coloração avermelhada (Tabela 2). De acordo com Roth, Moeller & Slinde (2004) e Lines & Kestin (2005), a força de contração muscular sofrida pelos peixes, durante a eletronarcose, pode

causar danos na coluna vertebral, lesionando a aorta dorsal, bem como as veias e causar hematomas no filé. O risco de ocorrerem essas lesões depende do tipo de corrente, frequência e da intensidade do campo elétrico utilizado. A cor instrumental medida nos filés apresentou valores de (média±desvio padrão) $L^* = 30,83 \pm 2,03$, $a^* = -2,13 \pm 0,79$ e $b^* = -0,50 \pm 0,96$ e não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Tabela 1. Médias do teste de ordenação de cor nos filés de tilápia do Nilo.

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

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

CONCLUSÕES

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

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

A avaliação sensorial demonstrou que nos filés dos peixes insensibilizados com 200 volts ocorreu maior intensidade de hemorragias, portanto recomenda-se utilizar o tratamento de 100 volts durante 60 segundos para insensibilizar tilápia do Nilo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa (CNPq n°475374/2012-6). A CAPES pela bolsa de doutorado concedida a primeira autora do artigo.

COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi aprovados pelo Comitê de Ética da USP sob número : 2012.1.1251.74.4

REFERÊNCIAS

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

ABNT (1994). Teste de ordenação em análise sensorial, Rio de Janeiro.

CIE (1978) Recommendations on uniform colourspaces–colour equations, psychometric colour terms., 15 (2), Paris.

EEC (1993) Official Journal of the European Communities., 340: 21–34.

EFSA (2004). Welfare Aspects of Animal Stunning and Killing Methods., 20-71.

EFSA (2009). Species-specific welfare aspects of the main systems of the stunning and killing of farmed Atlantic salmon., 1–77.

FAWC (1996). Farm Animal Welfare Council. London.

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

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

HUNTINGFORD, F.A. & KADRI, S. (2008). What is welfare? In: Branson, E.J. (Ed.) *Welfare Fish*. (pp.19-21) Blackwell Publishing.

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

KESTIN, S., WOTTON, S. & ADAMS, S. (1995). The effect of CO₂ concussion or electrical stunning of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* on fish welfare. In: Svennevig, N.; Gent, A.; Krogh, L. (Ed.) *Quality in aquaculture* (pp.380) Belgium: EAS Special Publication.

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

LAMBOOIJ, E., VAN DE VIS, J.W., KLOOSTERBOER, R.J. & PIETERSE, C. (2002). Welfare aspects of live chilling and freezing of farmed eel (*Anguilla Anguilla* L.): neurological and behavioral assessment. *Aquaculture.*, 210:159-169.

LINES, J.A., ROBB, D.H., KESTIN, S.C., CROOK, S.C. & BENSON, T. (2003). Electric stunning: a humane slaughter method for trout. *Aquacultural Engineering.*, 28(3-4):141–154.

Lines, J. & Kestin, S. (2005). Electric stunning of trout: power reduction using a two stage stun. *Aquacultural Engineering.*, 32:483–491.

MARX, H., BRUNNER, B., WEINZIERL, W., HOFFMAN, R. & STOLLE, A. (1997). Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung.*, 204:282–286.

NEWELL, G.J., & MAC FARLANE, J.D. (1987). Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *Journal of Food Science.*, 52(6):1721-1725.

NORDGREEN, A.H., SLINDE, E., MOLLER, D. & ROTH, B. (2008). Effect of various electric field strengths and current durations on stunning and spinal injuries of Atlantic herring. *Journal of Aquatic Animal Health.*, 20:110-115.

ROBB, D.H., & ROTH, B. (2003) Brain activity of Atlantic salmon *Salmo salar* following electrical stunning using various field strengths and pulse durations. *Aquaculture*, 216(1-4), 363–369.

ROTH, B., MOELLER, D., & SLINDE, E. (2004). Ability of electric field strength, frequency, and current duration to stun farmed Atlantic salmon and pollock and relations to observed injuries using sinusoidal and square wave alternating current. *North American Journal Aquaculture.*, 66:208–216.

SAS (2004). *Statistical Analysis Systems. User's guide. Version 9.1.* Cary

TOBIASSEN, T. & SØRENSEN, N.K. (1999). Influence of killing methods on time of death of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as measured by behavioral indices of sensibility and reflexes. In: *Proceedings of the aquaculture europe.*, 27:244.

VAN DE VIS, J.W., OEHELENSCHLÄGER, J., KUHLMANN, H., MÜNKNER, W., ROBB, D.F.H. & SCHELVIS-SMIT, A.A.M. (2001). Commercial and experimental slaughter of eel (*Anguilla anguilla*, L.): effect on quality and welfare. In: Kestin, S.C. & Warriss, P.D. (Ed.) *Farmed Fish Quality* (pp. 234–250). Oxford: Blackwell