



**MARCELO STEFANINI TANAKA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE  
FILÉS DE TILÁPIA TRATADOS COM SOLUÇÃO DE  
OZÔNIO E CLORO E ARMAZENADOS SOB  
REFRIGERAÇÃO**

**LAVRAS-MG  
2021**



**MARCELO STEFANINI TANAKA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE FILÉS DE TILÁPIA  
TRATADOS COM SOLUÇÃO DE OZÔNIO E CLORO E ARMAZENADOS SOB  
REFRIGERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alcinéia de Lemos Souza Ramos  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Emília de Sousa Gomes  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Tanaka, Marcelo Stefanini.

Qualidade microbiológica e físico-química de filés de tilápia  
tratados com solução de ozônio e cloro e armazenados sob  
refrigeração / Marcelo Stefanini Tanaka. - 2021.

52 p.

Orientador(a): Alcinéia de Lemos Souza Ramos.

Coorientador(a): Maria Emília de Sousa Gomes, Priscila Cotta  
Palhares, Eduardo Mendes Ramos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Pescado. 2. Sanitizantes. 3. Tilápia-do-Nilo. I. Ramos,  
Alcinéia de Lemos Souza. II. Gomes, Maria Emília de Sousa. III.  
Palhares, Priscila Cotta. IV. Ramos, Eduardo Mendes.

**MARCELO STEFANINI TANAKA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE FILÉS DE TILÁPIA  
TRATADOS COM SOLUÇÃO DE OZÔNIO E CLORO E ARMAZENADOS SOB  
REFRIGERAÇÃO**

**MICROBIOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL QUALITY OF TILAPIA  
FILLETS TREATED WITH OZONE AND CHLORINE SOLUTION AND STORED  
UNDER REFRIGERATION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 03 de agosto de 2021

Dr. Maria Emília de Sousa Gomes	UFLA
Dr <sup>a</sup> . Priscila Cotta Palhares	IF Sudeste MG
Dr. Eduardo Mendes Ramos	UFLA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alcinéia de Lemos Souza Ramos  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2021**

*Aos meus pais Massaki e Leonice,  
e a minha filha Mariana,  
por toda atenção, amor e carinho.  
Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família, em especial ao meu pai, Massaki, minha mãe, Leonice, e ao meu irmão, Túlio, que me apoiaram e me ajudaram a seguir sempre em frente, e a cada dificuldade, dialogada ou não, conseguiram me apoiar direta e indiretamente na minha vida pessoal e acadêmica para concluir mais essa etapa.

A minha filha, Mariana, que sempre me recebeu com amor e carinho a cada retorno a minha cidade, a família da Tamiris, mãe da Mariana, que também me apoiou nessa jornada desde quando me estabeleci em Lavras.

A minha orientadora, Professora Alcinéia, e a coorientadora, Professora Maria Emilia, pela oportunidade e confiança dadas a mim, além da amizade, incentivo e ensinamentos ao longo de dois anos. Ao Professor Eduardo, pelo apoio e aprendizado, que sempre se fez presente para sanar qualquer dúvida e por compor a banca, agregando valor ao trabalho. A Professora Priscila C. Palhares, por compor a banca e colaborar na melhoria do trabalho.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos (Código de Financiamento 001), e a FAPEMIG, pelo financiamento do projeto, sem o qual não poderia ter realizado a pesquisa.

Aos meus amigos do N.E.Ci.Di., Alexandre, Carlos Henrique, Fábio, Felipe, Fernando, Fredderico, Gustavo, Isabela, Joanna, Luan, Lucas, Mário, Marcos, Moyses, Renato, Samuel, Tales e Thiago, pelos vários anos de caminhada e que mesmo com alguns distantes, a amizade continua!

A República Vegas e aos moradores e ex-moradores com quem tenho eterna amizade como Marcim, Narks, Skda, Krusty, Palmirinha, D-Cibel, Punzel, Guinho, Forofó, Fredd, Jonathan, Proerd e Egíptico, um local repleto de felicidade, apoio e companheirismo onde tenho o prazer de morar!

Aos meus amigos do Laboratório de Carnes, Johnathan, Luiza, Maira, Bruna, Lorena, Angélica, Adelaide, Douglas, Ana Paula, Lethicia, Isadora, Lorrany e Jean, em destaque e com um carinho especial a Mariele, que me orientou e auxiliou durante o desenvolvimento do meu mestrado, a todos meus companheiros de bancada, agradeço-lhes eternamente!

A equipe do Laboratório de Pescados, com a qual tive a oportunidade de fazer amizade, Anderson, Roberta, Pedro, Flávia, Aline e em especial a Fran e Diana, que foram meus pilares para a execução desse projeto, juntamente com os puxões de orelha, incentivos, gargalhadas e bons momentos ao longo do tempo, pois sem vocês as provações teriam sido mais árduas. Em especial a Paula, pela amizade, incentivo, auxílio, paciência e companheirismo durante o desenvolvimento do meu projeto, além do espelho para prosseguir na carreira acadêmica, o meu eterno agradecimento!

Ao setor de piscicultura, ao Professor Rilke, equipe e demais pesquisadores, pelo fornecimento das tilápias e auxílio para execução do projeto. Ao laboratório de microbiologia de alimentos, Professora Roberta e a equipe de pesquisa, por auxílio e ceder espaço para realização das análises. Ao Professor Murgas, por permitir a utilização da máquina geradora de ozônio, e a Professora Sueli Costa (UFC), pelos ensinamentos na mensuração do ozônio.

Ao NEPOA e NEPECA, pela oportunidade de participar, aprender e agregar valor a ambos os grupos.

E a todos os demais que me apoiaram antes e durante minha pós-graduação.

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”*

*(Isaac Newton)*

## RESUMO

Os peixes são alimentos de alto valor nutricional para a dieta humana por serem ricos em proteínas, gorduras e minerais. Entretanto, esses se deterioram facilmente por ação de microrganismos mesmo quando acondicionados em ambiente refrigerado. Com o objetivo de conhecer a ação combinada de soluções sanitizantes sobre o filé, pesquisou-se a ação antimicrobiana e físico-química do ozônio aquoso e o cloro na lavagem dos filés imediatamente após a aplicação e seus efeitos durante o tempo de estocagem. Os filés foram tratados em banho de imersão por 5 minutos com água desmineralizada (T1), solução de cloro a 5 ppm (T2), solução de ozônio a 5 ppm (T3) e solução de cloro a 5 ppm com ozônio a 5 ppm (T4). Os efeitos imediatos após os tratamentos não alteraram a composição centesimal ou o pH dos filés. Houve a diminuição da contagem microbiana de mesófilos em 0,49 log UFC.g<sup>-1</sup> no T2 e 0,56 log UFC.g<sup>-1</sup> no T4. O T3 mostrou menores valores de oxidação lipídica, T1 e T3 demonstraram menores valores para bases nitrogenadas voláteis totais (BNVT). Os tratamentos não tiveram diferença entre si durante o tempo de armazenamento, houve aumento de lipídios, redução de proteínas, aumento de BNVT, oxidação lipídica e contagem de mesófilos e psicotróficos. Esses resultados são esperados devido a degradação microbiana durante o período de estocagem. Diante do observado, a ação combinada do sanitizante teve superioridade no controle microbiano quando comparado ao controle, mas não foi capaz de promover a vida útil do produto.

**Palavras-chave:** *Oreochromis Niloticus*. Pescado. Ozônio. Sanitização. Qualidade.



## ABSTRACT

Fish are foods with high nutritional value for the human diet because they are rich in proteins, fats and minerals. However, these easily deteriorate due to the action of microorganisms even when stored in a refrigerated environment. In order to know the combined action of sanitizing solutions on the fillet, the antimicrobial and physicochemical action of aqueous ozone and chlorine in washing fillets immediately after application and its effects during storage time was investigated. The fillets were treated in an immersion bath for 5 minutes with demineralized water (T1), 5 ppm chlorine solution (T2), 5 ppm ozone solution (T3) and 5 ppm chlorine solution with 5 ppm ozone (T4). The immediate effects after treatments did not change the proximate composition or the pH of the fillets. There was a decrease in the microbial count of mesophiles by  $0.49 \log \text{CFU.g}^{-1}$  at T2 and  $0.56 \log \text{CFU.g}^{-1}$  at T4. T3 showed lower values of lipid oxidation, T1 and T3 showed lower values for total volatile base nitrogen (TVB-N). The treatments were not different during the storage time, there was an increase in lipids, a reduction in proteins, an increase in TVB-N, lipid oxidation and mesophilic and psychrotrophic counts. These results are expected due to microbial degradation during the storage period. In view of what was observed, the combined action of the sanitizer had superiority in the microbial control when compared to the control, but it was not able to promote the shelf life of the product.

**Keywords:** *Oreochromis Niloticus*. Fish. Ozone. Sanitization. Quality.

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
2.1.	Tilápia-do-Nilo ( <i>Oreochromis Niloticus</i> ).....	14
2.2.	Qualidade do pescado durante o processamento.....	15
2.3.	Deterioração do pescado <i>post-mortem</i> .....	16
2.3.1.	Alterações físico-químicas e microbiológicas do pescado .....	17
2.4.	Cloro .....	19
2.5.	Ozônio.....	20
3.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1.	Obtenção e preparo das amostras.....	23
3.2.	Tratamentos .....	24
3.2.1.	Obtenção e quantificação de água clorada e ozonizada.....	24
3.3.	Análises físico-químicas .....	Erro! Indicador não definido.
3.3.1.	Composição Centesimal .....	25
3.3.2.	Determinação do pH .....	26
3.3.3.	Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (BNVT) .....	26
3.3.4.	Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS).....	26
3.3.5.	Análise de cor.....	26
3.4.	Análise microbiológica .....	27
3.4.1.	Mesófilos e Psicrotrofos .....	Erro! Indicador não definido.
3.5.	Análise estatística .....	27
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	29
4.1.	Determinação da temperatura e da concentração de cloro e ozônio .....	Erro! Indicador não definido.
4.2.	Composição centesimal .....	29
4.3.	Análises físico-químicas .....	Erro! Indicador não definido.
4.3.1.	Determinação do pH .....	31
4.3.2.	Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (BNVT) .....	33
4.3.3.	Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS).....	35
4.3.4.	Análise de cor.....	38
4.4.	Análises microbiológicas.....	41
4.4.1.	Mesófilos e Psicrotrofos .....	41

<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O pescado é um alimento presente na população desde a antiguidade, sendo lanças, redes, linhas e varas de pesca observadas em hieróglifos no Egito, datados por volta de 3500 a.C. Apresenta um apelo social, pois seu consumo é relacionado a uma alimentação saudável, por ser fonte de aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e gorduras poli-insaturadas, que possuem bom paralelismo com a saúde dos seres humanos. Segundo a FAO (2020), 17% de toda proteína animal consumida no mundo era derivada de peixes, com um consumo médio de 20,5 kg por habitante no ano.

Apesar da ampla gama de espécies capturadas e cultivadas no Brasil, a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis Niloticus*) tem destaque no aspecto de criação, devido a sua rusticidade e adaptação a vários sistemas de criação, além de apresentar um crescimento acelerado e pacotes de tecnologias já adequados ao cenário brasileiro. Além disso, seu filé possui excelente aceitabilidade pelo consumidor, devido a sua cor, sabor suave e ausência de espinhos, sendo agradável ao consumo por crianças. Entretanto, como a maioria dos pescados, o filé de tilápia como um todo é altamente perecível devido a suas características intrínsecas, como alta atividade de água e gorduras poli-insaturadas, baixa concentração de tecidos conectivos e pequenas quantidade de carboidratos como reserva energética no músculo.

O principal fator responsável pela deterioração de peixes é, sem dúvida, o microbiano. Por este naturalmente habitar sua pele, brânquias e trato gastrointestinal, a manipulação inadequada e as ferramentas empregadas durante o processamento podem ocasionar a contaminação cruzada. Dessa forma, são empregados sanitizantes para diminuir a contagem microbiana e elevar o tempo de vida de prateleira nesse produto.

Após a insensibilização e abate, o pescado é lavado com água já contendo algum sanitizante adequado pela legislação brasileira, o mesmo ocorrendo durante a etapa de processamento onde são obtidos os filés, sendo que os mesmos também passam por etapa de enxague. O cloro é um dos sanitizantes que mais se utiliza na indústria de alimentos. Contudo, seu emprego tem limitações tendo em vista que altas concentrações geram resíduos que deixam odor e sabor característicos no produto, além da formação de subprodutos com potencial cancerígeno quando em reação com matérias orgânicas.

Outro sanitizante em potencial é o ozônio, uma tecnologia emergente no processamento de pescados, que pode ser empregado nas embalagens, na higienização das câmaras frigoríficas, na produção de gelo ozonizado e diluído em água, sendo esta última uma forma interessante para controle microbiológico da mesma forma que o cloro. A aplicação da ação combinada de

ambos os sanitizantes pode aumentar a gama de ação contra microrganismos, além de diminuir as concentrações de ambos pelo sinergismo gerado.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos do tratamento com ozônio, cloro e a combinação na higienização de filés de tilápia, sobre a população microbiana contaminante, além dos efeitos sobre a vida útil e características físico-química dos filés armazenados sob refrigeração (7 °C).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis Niloticus*)

Tilápia é um nome genérico para especificar cerca de 70 espécies da família *Cichlidae*, que possui uma distribuição que engloba o centro-sul da África ao norte da Síria (IGARASHI, 2019). Entre essas espécies, a tilápia-do-Nilo se destaca para produção por sua rusticidade, possuindo tolerância à salinidade, temperatura, densidade populacional e tipos de sistema de produção, que quando intensivo tende a ter crescimento acelerado, aliado à sua resistência a doenças e aspecto alimentar onívoro. A facilidade na obtenção de larvas e seleção de machos por hibridação ou reversão sexual é outro atrativo, pois esses tendem a crescer de 18% a 25% mais rápidos em comparação com as fêmeas. Podem alcançar um peso de 800 g a 1,2 kg em seis ou sete meses, a depender de fatores como tipo de criação, qualidade nutricional da ração, qualidade da água e qualidade genética, com rendimento por filé variando de 26% a 37% (IGARASHI, 2019; SILVA et al., 2009; TURRA et al., 2010; VICENTE; ELIAS; FONSECA-ALVES, 2014).

Outro grande interesse por essa espécie é devido à sua qualidade nutricional, possuindo todos os aminoácidos essenciais e proteínas de alta digestibilidade. É fonte de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e do complexo B, de minerais como ferro, fósforo e cálcio, apresenta ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 e baixo teor de colesterol (MOURA et al., 2009). Além disso, sua carne é branca, possui textura firme, odor e sabor suaves, ausência de espinhas em forma de “Y”, sendo de fácil filetagem e tendo ótima aceitação no mercado (SILVA et al., 2009). Em sua composição centesimal o filé possui em torno de 78,08% de umidade, 20,08% de proteína, 1,7% de gorduras totais e 0,93% de cinzas (UNIFESP, 2014). Além disso, ainda pode ser comercializado na forma de outros produtos como *surimi*, empanados e embutidos, e os resíduos da filetagem utilizados na produção de farinha para uso em rações, óleo e obtenção de silagem, além da produção de couro a partir da pele para utilização na confecção de vestuário, entre outros (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2018).

Com uma produção de mais de 758 mil toneladas de peixes em 2019, a piscicultura brasileira ocupa o quarto lugar na produção mundial. A tilápia representa 57% desse total, com cerca de 432 mil toneladas produzidas no território nacional, sendo Minas Gerais o quarto produtor nacional dessa espécie, com uma média de 36,35 mil toneladas, atrás apenas do Paraná, São Paulo e Santa Catarina (PEIXE BR, 2020).

## 2.2. Qualidade do peixe durante o processamento

Cada vez mais os consumidores estão mais exigentes com seus produtos, dessa forma, as indústrias vêm buscando se adaptar e atender essa tendência mundial na confecção de itens com qualidade. Assegurar produtos que satisfaçam suas necessidades, e ao mesmo tempo sejam seguros, é o objetivo primordial na produção de alimentos (RIBEIRO et al., 2009).

De fato, os produtos da pesca tendem a ser mais perecíveis se comparados com alguns outros produtos de origem animal, tanto pelas suas características intrínsecas, como por razão do seu habitat natural. A elevada quantidade de água, tipos de proteínas e baixo teor de tecido conjuntivo, além da população bacteriana psicrófila natural, contribuem para a rápida desvalorização ou rejeição do produto. A manipulação que ocorre nos peixes, desde a sua captura até o processamento, tem grande impacto em sua qualidade, podendo ser determinante na intensidade da ocorrência das alterações enzimáticas, oxidativas e bacterianas. A velocidade com que cada uma se desenvolve depende de como foram aplicados os princípios básicos de conservação, o tipo de espécie e as formas de captura (SOARES; GONÇALVES, 2012). Tanto as escamas como o muco liberado dos peixes propiciam uma proteção física aos microrganismos, e o processo de descamação e lavagem do peixe inteiro pode liberar bactérias nos equipamentos e local de processamento. O muco, por ser um composto orgânico, acaba por diminuir a eficiência dos agentes oxidativos se presentes no produto (LUIZ et al., 2017).

Fatores como deficiência no processo de sanitização dos equipamentos e utensílios utilizados nas etapas de processamento, sujidades, biofilmes e o não emprego correto dos procedimentos de higienização, somadas ao contato direto que o pescado tem com os manipuladores (que também podem apresentar higiene pessoal inadequada), transformam-se em potenciais fontes de contaminação (SOUSA et al., 2011). Em vista disso, durante o processamento para retirada da pele ou filetagem, os manipuladores e/ou os materiais utilizados para esse beneficiamento podem levar a transmissão de microrganismos deterioradores ao produto inócuo através de contaminação cruzada, resultando em uma perda da qualidade sensorial e nutricional com diminuição da sua vida de prateleira (FURLAN et al., 2014; SOUSA et al., 2011; TEIXEIRA; GARCIA, 2014). O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) determina, durante o processamento, a lavagem apenas dos pescados inteiros (BRASIL, 2020). As indústrias que processam alimentos seguem rigorosamente a legislação, higienizando local de estocagem, caixas, ferramentas e a planta de processamento. Entretanto, não se consegue eliminar toda a população bacteriana desses locais ou objetos, o que poderia causar uma contaminação, mesmo que mínima, nos filés durante o seu

processamento (ARAÚJO; SOARES; GÓIS, 2010). O Manual Técnico de Manipulação e Conservação de Pescado orienta a lavagem do filé com água hiperclorada, contendo de 2,5 mg/L a 5,0 mg/L de cloro livre, após filetagem (EMBRAPA, 2018).

### **2.3. Deterioração do pescado *post mortem***

Após a morte do pescado inicia-se a sua deterioração, pois suas células não são mais capazes de manter a homeostasia, levando a alterações físico-químicas. São decorrentes tanto por ação de microrganismos como por substâncias autógenas, que alteram a qualidade do pescado e são perceptíveis ao consumidor através do odor, sabor, textura e cor (FURLAN et al., 2014). Características como rápida resolução do *rigor mortis*, pH próximo da neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos e altos teores de nutrientes, que ficam disponíveis aos microrganismos pela ação destrutiva de enzimas endógenas (catepsinas e calpaínas) são fatores que contribuem para que o pescado seja mais suscetível a perda de qualidade. (ARAÚJO; SOARES; GÓIS, 2010; FURLAN et al., 2014; SOUSA et al., 2011; TEIXEIRA; GARCIA, 2014).

As alterações se iniciam através de ação autolítica de enzimas musculares que degradam proteínas e gorduras, seguida da ação de microrganismos. Por um breve período, o músculo ainda fornece energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) para a sua manutenção, mas com a ausência de circulação não há reabastecimento das células com oxigênio, nem a remoção de metabólitos celulares, levando a um estresse celular com produção de ATP através do metabolismo anaeróbico. Essa via da produção de energia leva a um acúmulo de ácido lático, provocando a queda do pH. Com a impossibilidade da manutenção energética, a célula entra em esgotamento e lise, liberando enzimas endógenas em células e tecidos próximos, em um evento em cadeia e, dessa forma, microrganismos que estavam em outros órgãos são capazes de acessar a musculatura íntegra do pescado (GONÇALVES, 2011). Quando há ausência de boas práticas do bem-estar animal, aumentam-se as chances de estresse do peixe durante a captura ou despesca, fazendo com que haja uma considerável perda das reservas de glicogênio muscular, levando a uma menor redução do pH no músculo. Por esse motivo, a fase de *rigor mortis* nos peixes costuma ser mais breve quando comparado a outras espécies, como os bovinos e suínos. Com isso, as alterações microbiológicas se iniciam mais rapidamente, tornando a vida útil dos filés de peixe menores do que dos outros animais (OGAWA; MAIA, 1999).



### 2.3.1. Alterações físico-químicas e microbiológicas do pescado

Para a avaliação do frescor do pescado pode-se utilizar, além de métodos sensoriais, testes microbiológicos e químicos, que comumente são mais objetivos (ARAÚJO; SOARES; GÓIS, 2010). Os testes químicos quantificam a atividade de enzimas endógenas e bacterianas que atuam no produto, por meio da concentração de bases nitrogenadas voláteis no músculo e de outros compostos mensuráveis (FURLAN et al., 2014). A quantificação dessas substâncias formadas pode ser correlacionada a degradação do pescado (SOARES; GONÇALVES, 2012).

Com um pH próximo da neutralidade, o pescado é propício ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patógenos. Segundo a Instrução Normativa nº 21 do MAPA, publicada dia 31 de maio de 2017, que traz o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade para o Peixe Congelado, o limite máximo para o pH é de 7,00 nos peixes (BRASIL, 2017), não havendo distinção entre as diversas espécies. A oscilação do pH costuma ser ligeira, já que as reservas de glicogênio nos peixes são pequenas e as condições de captura, que geram estresse, aumentam a velocidade de depleção dessas pequenas reservas. A carne de peixe, de um modo geral, tem valores de pH em torno de 6,2 a 6,4, sendo que este índice, isoladamente, nunca é confiável para avaliação da deterioração em carnes (ARAÚJO; SOARES; GÓIS, 2010; FURLAN et al., 2014).

A cor dos alimentos não costuma ser estável, podendo ser mutável a medida em que se diminui o frescor. A aparência do pescado fresco pode, em apenas algumas horas após a morte, mudar para uma coloração menos atraente. As características da cor do músculo podem ser afetadas tanto pelo estresse antes do abate como pela idade do animal, a metodologia empregada na medição da cor, tipos de dieta, degradação microbiológica com alteração do pH e produção e compostos voláteis e mesmo pelos tratamentos antimicrobianos aplicados aos produtos. Instrumentalmente, a cor pode ser avaliada pelos parâmetros L\*, a\* e b\*, ao passo que L\* indica a luminosidade, a\* intensidade da cor vermelho-verde e b\* intensidade da cor amarela-azul, do sistema CIELab (NOLLET; TOLDRÁ, 2009).

A oxidação dos lipídios do pescado ocorre pela remoção de elétrons de um átomo ou conjunto de átomos, sendo principalmente ocasionado pelo oxigênio atmosférico e, em menor escala, por ozônio, peróxidos, metais e outros agentes oxidantes. Sua ocorrência leva a formação de radicais livres e altera propriedades como de sabor, aroma, textura e cor. Devido a gordura do pescado apresentar um maior grau de insaturação em seus ácidos graxos, sua

oxidação é mais susceptível e ocorre mais rapidamente do que em outros animais, resultando em um produto de sabor e odor rancificados (SOARES; GONÇALVES, 2012). Sua quantificação se dá pela avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em que o malondialdeído (MDA), um dos produtos da decomposição de ácidos graxos poli-insaturados, é usado como composto referência. Valores em torno de 1,0 mg/kg de MDA já podem indicar odor de ranço, acima de 3,0 mg/kg de MDA já sugerem mau estado de conservação (FURLAN et al., 2014; MONTEIRO et al., 2012; TOMITA, R. Y. et al., 2010).

Substâncias como amônia, trimetilamina, etilamina, monometilamina, putrescina, cadaverina e espermidina são denominadas como bases nitrogenadas voláteis totais (BNVT), sendo a amônia o principal componente nas alterações químicas de peixes de água doce. No músculo do pescado, quando as proteínas sofrem ação enzimática e bacteriana produzem aminas que se acumulam durante a deterioração, sendo um fator correlacionável com aumento da quantidade de microrganismos presentes na carne. É um método relativamente simples e muito utilizado para avaliação do fresco do pescado, sendo um indicativo de rejeição do produto quando apresenta valores muito elevados (FURLAN et al., 2014). As BNVT não devem ser utilizadas como único parâmetro de qualidade para frescor, pois podem ser muito variáveis entre peixes da mesma espécie por conta de fatores biológicos, época do ano e qualidade da água em que foram cultivados (SOARES; GONÇALVES, 2012). A Instrução Normativa nº 21 do MAPA preconiza o limite de 30 mg de nitrogênio em 100 g de amostra de tecido muscular analisado (BRASIL, 2017).

A microbiota dos pescados tropicais tende a ter um comportamento mesofílico, mas essa é pouca adaptada a temperatura de refrigeração, podendo ser eliminada com o passar do tempo sob essas condições durante estocagem. Dessa forma, ocorre uma seleção de cepas de psicotróficos, que se multiplicam em alimentos refrigerados, mas tem faixa de crescimento ótima na temperatura das mesófilas. Apesar da velocidade de multiplicação estar prejudicada pela temperatura, ela pode limitar a vida útil de pescados tropicais em cerca de 30 dias quando refrigeradas a 0 °C. A legislação brasileira não estabelece limites para microrganismos mesófilos e psicotróficos, mas a *International Commission on Microbiological Specification for Foods* considera 7 log UFC.g<sup>-1</sup> para contagem padrão em placas o limite máximo em pescados refrigerados (FURLAN et al., 2014). Em trabalho realizado por Soccol et al. (2005) foi observado crescimento em torno de 7 log UFC.g<sup>-1</sup> de bactérias psicotróficos após 20 dias em filés de tilápia embalados com filme EVOH (copolímero de etileno e álcool vinílico) ou a vácuo, tratados com ácido acético a 1% e refrigerados a 1 °C. Monteiro et al. (2012) encontraram valores de aproximadamente 8 e 9 log UFC.g<sup>-1</sup> para mesófilos e psicotróficos armazenados a

0 °C após 4 dias, relatando que as amostras foram rejeitadas sensorialmente no 5º dia de estocagem.

Apesar da microbiota da pele dos peixes ser menos estudada do que outras estruturas, elas podem ser utilizadas como marcadores biológicos para indicar a origem da captura na natureza ou local de cultivo. Os estudos ainda não apontam uma correlação entre uma microbiota específica para cada espécie, mas ela tende a representar a microbiota da água onde o peixe foi cultivado (LARSEN et al., 2013). Na pele da tilápia já foram detectadas espécies do gênero *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Falvobacterium*, *Globicatella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Vibrio* (FUENTES et al., 2011; LIMA JUNIOR et al., 2016). Com relação à segurança microbiológica dos alimentos, a IN nº 21 do MAPA estabelece critérios microbiológicos apenas para *Salmonella* ssp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli* (BRASIL, 2020). Essas bactérias determinadas pela legislação, geralmente, não levam a alteração na aparência do pescado e não se reproduzem em temperatura de refrigeração, mas são patogênicas ao homem pois suas células e toxinas podem permanecer viáveis no alimento mesmo sem o deteriorar (FURLAN et al., 2014; SOARES; GONÇALVES, 2012).

Os microrganismos que causam deterioração podem advir tanto da água de cultivo, como da sua microbiota natural, localizada no intestino, brânquias, pele, escamas e muco superficial. Quando presentes no ambiente do beneficiamento do pescado, encontram-se nos instrumentos e locais de processamento, sendo disseminados através dos colaboradores por contaminação cruzada. Dessa forma, o filé de pescado se revela um potencial recipiente para bactérias patogênicas e deteriorantes durante sua manipulação e processamento pela contaminação cruzada advindo de si próprio, do ambiente ou de ferramentas, sendo necessária utilização de sanificantes para seu controle (FURLAN et al., 2014).

#### **2.4. Cloro como agente antimicrobiano**

O cloro e suas várias formas, como o hipoclorito de sódio, são provavelmente os compostos mais utilizados para controle microbiológico da água e na indústria de alimentos. Tem como atrativo o baixo custo e fácil acesso, tanto para indústria como para uso doméstico (BOTH; LONGARAY; AVANCINI, 2009). O seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, mas acredita-se que ele provoca uma reação de oxidação nas membranas microbianas, com lise e aumento da permeabilidade celular, levando ao extravasamento de macromoléculas e entrada do cloro, inativando enzimas que participam do metabolismo da

glicose, danos ao material genético e oxidação de proteínas (HELBLING; VANBRIESEN, 2007; MACHADO et al., 2010). Alguns organismos podem resistir a ação do cloro através da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que compõem o biofilme bacteriano, formando uma barreira que resiste à oxidação e protege a membrana celular (VIRTO et al., 2005).

Além da utilização para tratamento de água, na indústria o cloro é aplicado sobre a superfície de alimentos crus ou que serão processados. Para isso, é utilizado em altas concentrações para uma eliminação microbiana mais eficiente, inviabilizando a sobrevivência. Entretanto, o uso de altas concentrações pode formar subprodutos com potencial risco para a saúde do consumidor, além de sabores e odores não desejáveis. Se utilizados em baixos níveis, as lesões podem não ser fatais, e os microrganismos acabam por se regenerar (VIRTO et al., 2005).

O Manual de Procedimento para Implantação de Estabelecimento Industrial de Pescado do MAPA recomenda a lavagem do pescado com água a 5 ppm sem uma determinação de tempo (BRASIL, 2007). Bremer e Osborne (1998) testaram diferentes concentrações e tempos na redução de bactérias aeróbicas e *Listeria monocytogenes* em Salmão-Rei e conseguiram uma redução de mais de 99% com o uso de 130 a 200 ppm por até 120 minutos. Os mesmos autores comentam que uma efetividade similar poderia ser obtida com períodos mais curtos de lavagem, e a redução de bactérias na pele pode diminuir a população bacteriana total que poderia ser transmitida para a carne durante a filetagem.

O cloro em contato com matéria orgânica se decompõe rapidamente, podendo formar subprodutos como os trihalometanos (THMs), que é carcinogênico para humanos. Um experimento realizado com a lavagem de peixes *Pangasius* a 10 ppm de cloro por 40 segundos revelou valores residuais de THM abaixo de 4,2 µg/kg nos filés, em contrapartida não houve redução microbiana nos peixes e a água de lavagem apresentou um aumento significativo na contagem bacteriana. O autor comenta que essa proliferação provavelmente se deve a presença de nutrientes de matéria orgânica que foram liberados na água durante a lavagem do pescado (TONG THI et al., 2016). A Portaria nº 2.914 publicada em 12 de dezembro de 2011 limita a presença de trihalometanos em 0,1 mg/L nas águas para consumo humano (BRASIL, 2011).

## **2.5. Ozônio como agente antimicrobiano**

O ozônio é utilizado há vários anos no tratamento microbiológico da água de consumo, recreação e esgoto, podendo atingir um poder oxidante até 50% superior ao cloro, sendo

utilizado na forma de gás ou dissolvido na água. Na indústria de alimento é aplicada em fruta, vegetais, carnes e bebidas, melhorando a segurança em relação a população microbiana e prolongando a vida de prateleira dos produtos alimentícios, sem alterações significativas nas qualidades nutricionais, físicas e químicas. O gás em doses elevadas é tóxico ao ser humano (BRODOWSKA; NOWAK; ŚMIGIELSKI, 2018). Doses menores que 0,1 mg/L já são irritantes ao nariz, garganta e olhos. Exposição prolongada a partir de 1,0 mg/L é considerada fatal e acima de 15 mg/L por uma hora já é capaz de causar toxidez e morte. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 15 do Ministério do Trabalho, de 06 de julho de 1978, considera que em uma semana o trabalhador pode ficar exposto no máximo a 0,08 ppm ou 0,16 mg/m<sup>3</sup> (DA SILVA et al., 2011).

A conversão de oxigênio (O<sub>2</sub>) em ozônio (O<sub>3</sub>) pode ser realizada através do ar ou fonte rica em oxigênio pela geração de um campo elétrico (processo corona), radiação ultravioleta (fotoquímico) ou reação química. Por ter uma rápida degradação, retornando a oxigênio, deve ser gerada imediatamente antes do seu uso, com uma produção constante durante a aplicação. Comercialmente o processo corona é o mais utilizado, quando o ar ou gás rico em oxigênio passa por dois eletrodos, com uma tensão geralmente entre 1000V e 5000V, ocorrendo a dissociação da molécula de oxigênio em dois átomos de oxigênio, que livres vão reagir com outras moléculas de oxigênio gerando o ozônio. Quando se utiliza ar, até 4% da massa pode ser transformada em ozônio, e até 14% quando aplicado oxigênio puro. Na água, a solubilidade do ozônio pode ser 10 vezes superior à do oxigênio, apesar de ela decair mais rápido quando comparados. Em temperatura elevadas e pH maior que 7,0 a decomposição também é mais rápida. Em água destilada a 20 °C, cerca de 50% do ozônio é perdido em 20 minutos, restando apenas 10% após 85 minutos. Em temperatura ambiente e pH igual a 7, metade do ozônio é degradado em cerca de 17 minutos. Uma maior solubilidade é encontrada em temperaturas mais próximas de 0 °C, sendo insolúvel acima de 60 °C. A presença de matéria orgânica também aumenta a taxa de decomposição, mas não altera a eficiência da desinfecção (BRODOWSKA; NOWAK; ŚMIGIELSKI, 2018; DA SILVA et al., 2011).

Dois mecanismos de ação do ozônio nos microrganismos são sugeridos, o primeiro é que ocorra a oxidação de enzimas, peptídeos e proteínas, e o segundo é a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. São causados danos as membranas microbianas com extravasamento de conteúdo celular, podendo levar a uma lise, além da ação sobre o material genético. Pode atuar em bactérias, vírus, protozoários, bolores e leveduras, além de poder atingir as formas esporuladas e cistos de protozoários. A redução de 99% de bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* foi observada em uma concentração entre 0,23 e 0,26 ppm por 1,67

minutos em água ozonizada. Uma concentração de 2,2 ppm por 19 minutos foi capaz de reduzir 99% de *E. coli* e *Streptococos* no tratamento de efluentes. Água para lavagem de carcaças de frango com 2,1 ppm de ozônio mostrou uma redução de 95% na contagem microbiana sem alterações na cor, sabor ou odor. Filés de peixe tratados com 10 ppm de ozônio aumentaram 25% da vida útil, mas apresentaram pequeno aumento na rancidez oxidativa e alteração da cor. (BRODOWSKA; NOWAK; ŚMIGIELSKI, 2018; DA SILVA et al., 2011). O ozônio é muito eficaz para a remoção de coliformes e bactérias resistentes ao cloro, além de ser capaz de degradar alguns compostos orgânicos que poderiam gerar subprodutos da reação com o cloro, como os trihalometanos. A utilização de 50 mg/L foi capaz de reduzir até 88% de formação de clorofórmio (VERMA; GUPTA; GUPTA, 2016).

Silva e Gonçalves (2017) conseguiram reduzir 88,25% da contagem de mesófilos na pele de tilápia e 79,4% nos filés após tratamento por 15 minutos com 1,5 ppm de ozônio diluído em água, e aumento significativo também foi relatado nos valores de TBARS conforme elevava a concentração de ozônio da água. Ao utilizar 2 ppm por 5 minutos, Tomita et al. (2010) não encontraram diferença significativa na qualidade microbiológica e vida útil quando refrigerado do peixe marítimo goete ao comparar com o controle, que só utilizou água para lavagem. Em estudo realizado por Garcia, Mount e Davidson (2003), com o uso de água ozonizada e clorada na lavagem de verduras, foi observado que o uso de 2,5 mg/L de ozônio com 100 mg/L de cloro livre teve uma efetividade levemente superior a utilização de apenas 200 mg/L de cloro, mostrando que o ozônio pode ser utilizado para reduzir os níveis de cloros aplicados na água de lavagem para controle microbiológico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas nas dependências da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais. A primeira etapa foi a obtenção da matéria-prima, realizada no Centro de Pesquisa e Difusão de Tecnologia em Aquicultura, no Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia (DZO) da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária (FZMV/UFLA). Na segunda etapa, a obtenção da água ozonizada foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia (SFF) do Departamento de Medicina Veterinária (DMV/FZMV) e as análises laboratoriais foram realizadas na Planta Piloto de Pescados e nos Laboratórios de Análises Avançadas, de Tecnologia de Carnes e Derivados (LabCarnes) e de Microbiologia dos Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da Escola de Ciências Agrárias de Lavras (ESAL/UFLA).

#### 3.1. Obtenção e preparo das amostras

A pesquisa com animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFLA sob parecer número 013/20. As tilápias do sexo masculino foram criadas em tranques-redes e alimentadas com ração comercial no Setor de Piscicultura, até atingirem acima de 500 g. A despesca foi realizada em quatro tempos, sendo retirada de 9 kg a 10 kg de peixe a cada despesca. A insensibilização foi realizada conforme protocolo de Pedrazzani et al. (2009), através de secção da medula espinhal e sangria por corte das brânquias. Após o abate, os peixes foram processados em temperatura ambiente, retirando-se os filés sem pele e escamas, sem evisceração prévia, seguida do acondicionamento em bandejas brancas de polietileno. Foram obtidas de 2,5 kg a 3,0 kg de filés sem pele a cada despesca. Os filés, sem lavagem prévia, foram então colocados em sacos plásticos de polietileno e acondicionados em caixas de isopor com gelo para transporte até a Planta Piloto de Pescados, onde foram armazenados em refrigerador (modelo RDV48, Continental, Curitiba, PR, Brasil) com temperatura controlada a 7 °C ( $\pm 2$  °C) por 15 horas para resolução do *rigor mortis* antes de serem submetidas aos tratamentos no dia seguinte.

### **3.2. Tratamentos dos filés**

Foram separadas 100 g ( $\pm 10$  g) de filés de tilápia retirados aleatoriamente e analisados em triplicata para os parâmetros físico-químicos e em duplicata para os parâmetros microbiológicos antes da aplicação de qualquer tratamento. Em seguida, os filés foram separados aleatoriamente em quatro tratamentos:

- Tratamento 1: controle (água desmineralizada);
- Tratamento 2: água desmineralizada clorada a 5 ppm;
- Tratamento 3: água desmineralizada ozonizada a 5 ppm; e,
- Tratamento 4: água desmineralizada ozonizada a 5 ppm e clorada a 5 ppm.

O experimento consistiu na imersão de 600 g ( $\pm 15$  g) de filés em bandejas brancas (6,5 x 19,5 x 31,0 cm) de polietileno de alta densidade contendo 1,6 L de solução para cada tratamento. Os filés permaneceram em imersão na solução de estudo por 5 minutos, estando as bandejas acondicionadas em bandejas maiores com gelo para manutenção da temperatura. Um termômetro foi utilizado para verificar a temperatura das soluções no início da aplicação de cada tratamento. Logo após, os filés foram mantidos por mais 5 minutos sobre grades metálicas para drenagem do excesso de água.

Os filés de cada tratamento foram, então, divididos em 4 porções de 150 g ( $\pm 10$  g) correspondentes a cada dia de análise, acondicionados em bandejas de poliestireno recobertas com filme plástico de polivinil cloreto (PVC) e estocados em refrigerador (modelo RDV48, Continental, Curitiba, PR, Brasil) com temperatura controlada a 7 °C ( $\pm 2$  °C). Nos tempos de 0, 3, 4 e 9 dias de estocagem uma amostra de cada tratamento foi aleatoriamente coletada para condução das análises físico-químicas (em triplicata) e microbiológicas (em duplicata).

#### **3.2.1. Obtenção e quantificação de água clorada e ozonizada**

A obtenção da água ozonizada a 5 ppm (tratamento 3) por efeito corona em oxigênio purificado, obtido de um cilindro de oxigênio com 90% de pureza, utilizando um gerador de ozônio O&L 1,5 RM (Ozone & Life, São José dos Campos, SP, Brasil) com o regulador de



fluxo de oxigênio a uma vazão de 0,5 L/min e o ozonizador na dosagem 10. Desse modo foi obtido 30 µg/L de ozônio, segundo o fabricante. Através de mangueira acoplada ao aparelho, o gás produzido foi difundido durante 4 minutos através de pedra porosa cilíndrica (3,3 cm x 1,5 cm de diâmetro) colocada no fundo de uma garrafa de politereftalato de etileno, com baixa permeabilidade a gases, contendo 2 L de água desmineralizada em torno de 4 °C. Durante cada repetição, duas garrafas eram ozonizadas, sendo essas acondicionadas em isopor com gelo artificial (GeloTech, modelo 1000s) para manutenção da temperatura durante todo o processo de obtenção da água ozonizada até a sua utilização.

Para o preparo da água clorada a 5 ppm (tratamento 2) e da água ozonizada a 5 ppm e clorada 5 ppm (tratamento 4), foi adicionado 0,45 mL de uma solução de hipoclorito de sódio a 2% em 1,8 L de água desmineralizada e 1,8 L de água ozonizada a 5 ppm, respectivamente.

As concentrações de cloro e ozônio foram mensuradas antes da imersão dos filés nas soluções através da metodologia 2350.B da *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017), pelo método iodométrico. Amostras (em duplicata) de 100 mL dos tratamentos 2 e 3 e do tratamento 4 antes e após cloração foram coletadas, transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 1 g de iodeto de potássio, o pH da solução foi reduzido para valores entre 3,0 a 4,0 utilizando-se ácido acético glacial. O iodo livre liberado pela reação de ambos os oxidantes foi titulado através de uma solução de tiosulfato de sódio 0,01 N até atingir uma cor amarelo claro, sendo em seguida utilizado solução de amido 1% como indicadora e continuada a titulação até a coloração transparente. O volume gasto na titulação é aplicado na fórmula do cálculo de concentração de cloro, conforme Equação 1, e o resultado obtido em mg/L de cloro, sendo depois multiplicado pelo fator 0,68 para se obter os valores em mg/L de ozônio (BUCHAN; MARTIN-ROBICHAUD; BENFEY, 2005).

$$mg/L Cl_2 = \frac{N \cdot V \cdot fc \cdot 35450}{100} \quad (1)$$

$N$  = normalidade do tiosulfato de sódio.

$V$  = volume gasto de tiosulfato de sódio para titulação.

$fc$  = fator de correção da solução de tiosulfato de sódio.

### 3.3. Metodologia analítica

#### 3.3.1. Composição centesimal

A determinação da composição centesimal seguiu as Normas Analíticas do Instituto Adolph Lutz (SÃO PAULO, 2008): a umidade foi determinada na perda de massa da amostra por secagem em estufa a 105 °C até a obtenção do peso constante; as cinzas pela pesagem dos resíduos obtidos após aquecimento em mufla a 550 °C até peso constante; os lipídios através do método de Folch, pela separação em clorofórmio, metanol e água; e a proteína bruta estimada pelo método de microKjeldahl, utilizando o fator de conversão de 6,25. Todas as análises foram realizadas em triplicada.

### **3.3.2. Determinação do pH**

Foi mensurada em triplicata nos filés de tilápia através de um potenciômetro digital de penetração (modelo HI 99163, Hanna Instruments, Barueri, SP, Brasil), previamente calibrado com soluções tampões de pH 4 e 7.

### **3.3.3. Bases nitrogenadas voláteis totais**

Para determinação das BNVT utilizou-se metodologia do manual de Métodos para Análises de Pescado da EMBRAPA (FOGAÇA et al., 2009). As amostras foram coletadas em triplicata, sendo a extração realizada com ácido tricloroacético, seguida por destilação, arraste por vapor em solução receptora e titulação.

### **3.3.4. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

A mensuração da oxidação lipídica foi realizada em triplicata, através da metodologia descrita por Salih (1987), por meio da qual a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi observada por método colorimétrico utilizando um espectrofotômetro (modelo SP-220, Biospectro, Curitiba, PR, Brasil) em comprimento de onda de 532 nm e os resultados expressos em miligramas de malonaldeído por quilo de amostra (mg MDA/kg).

### **3.3.5. Análise de cor**

A cor instrumental dos filés foi avaliada em três pontos distintos por amostra através de colorímetro portátil Nix Color Sensor Pro (NPRO; Nix Sensor, Ltd, Burlington, Ontário, Canadá), nas escalas L\*(luminosidade (L\*), índice de vermelho-verde (a\*) e índice de amarelo-azul (b\*) do sistema CIELab. Todas as amostras foram verificadas em triplicata.

### **3.4. Análise microbiológica**

Para determinação do número de microrganismos mesófilos e psicrotróficos seguiram-se protocolos descritos por Silva et al. (2017). Ágar padrão para contagem em placas (PCA) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) foi o meio utilizado para quantificação de mesófilos e psicrotróficos. Cerca de 10 g de amostra foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada 0,1% (p/v) em sacos plásticos estéreis no aparelho *Stomacher* (modelo 400 Lab, Seward Stomacher, NY, EUA) por 5 minutos a 490 golpes por minuto. Diluições sucessivas foram obtidas através de uma alíquota de 1 mL das diluições anteriores, que foi transferida e homogeneizada em frascos estéreis contendo 9 mL de água peptonada 0,1% até a obtenção das diluições necessárias em cada tempo de análise.

A contagem de mesófilos foi realizada por técnica de plaqueamento em profundidade, onde 1 mL de cada diluição foi depositado em placas de Petri descartáveis e vertido cerca de 15 mL do meio de cultura em temperatura de aproximadamente 45 °C. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. A determinação de psicrotróficos foi feita por plaqueamento em superfície, onde placas estéreis contendo ágar solidificado foram inoculadas com 0,1 mL das diluições preparadas e espalhadas com auxílio de alça de Drigalski, sendo incubadas em temperatura de 7 °C por 10 dias. As placas que apresentavam de 25 a 250 colônias foram eleitas para contagem. O número médio de colônias por grama de amostra contabilizada nas placas eleitas foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente, sendo expresso o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos aeróbios mesófilos e aeróbios psicrotróficos em  $\log \text{UFC.g}^{-1}$ .

### **3.5. Análise estatística**

O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos casualizados (DBC) em que cada despesca (bloco) correspondeu a uma repetição, totalizando 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), considerando 5% de significância e, quando necessário, as médias foram separadas pelo teste de Scott Knott.

Para verificar o efeito dos tratamentos nos filés de tilápia estocados sob refrigeração, o experimento foi conduzido em um fatorial 4x4 (4 tratamentos x 4 tempos). Os dados obtidos foram submetidos a ANOVA seguidos de regressão, em caso significativo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Condições das soluções dos tratamentos

Os valores de temperatura e das concentrações de cloro e ozônio das soluções de cada tratamento estão apresentados na Tabela 1. Os valores de temperatura não foram estatisticamente diferentes ( $P > 0,05$ ) durante todo o experimento, não sendo esse um fator a se considerar na interpretação dos resultados.

Tabela 1 – Valores de temperatura, concentração de cloro e concentração de ozônio para cada tratamento.

Soluções	Temperatura (°C)	Cloro (mg/L de Cl <sub>2</sub> )	Ozônio (mg/L de O <sub>3</sub> )
Controle	5,23 ± 0,98	-	-
Cloro	5,88 ± 1,09	5,11 ± 0,29	-
Ozônio	5,00 ± 0,83	-	4,91 ± 0,28
Cloro + Ozônio	4,80 ± 0,71	5,23 ± 0,36	4,88 ± 0,16

Fonte: Do autor (2021).

### 4.2. Análises

#### 4.2.1. Composição centesimal

Os tratamentos não afetaram ( $P > 0,05$ ) a composição centesimal dos filés quando comparados à matéria-prima, tendo como valores médios: 76,15 ± 3,05% de umidade; 1,93 ± 0,33% de lipídeos; 17,46 ± 0,80% de proteínas; e 0,99 ± 0,29% de cinzas.

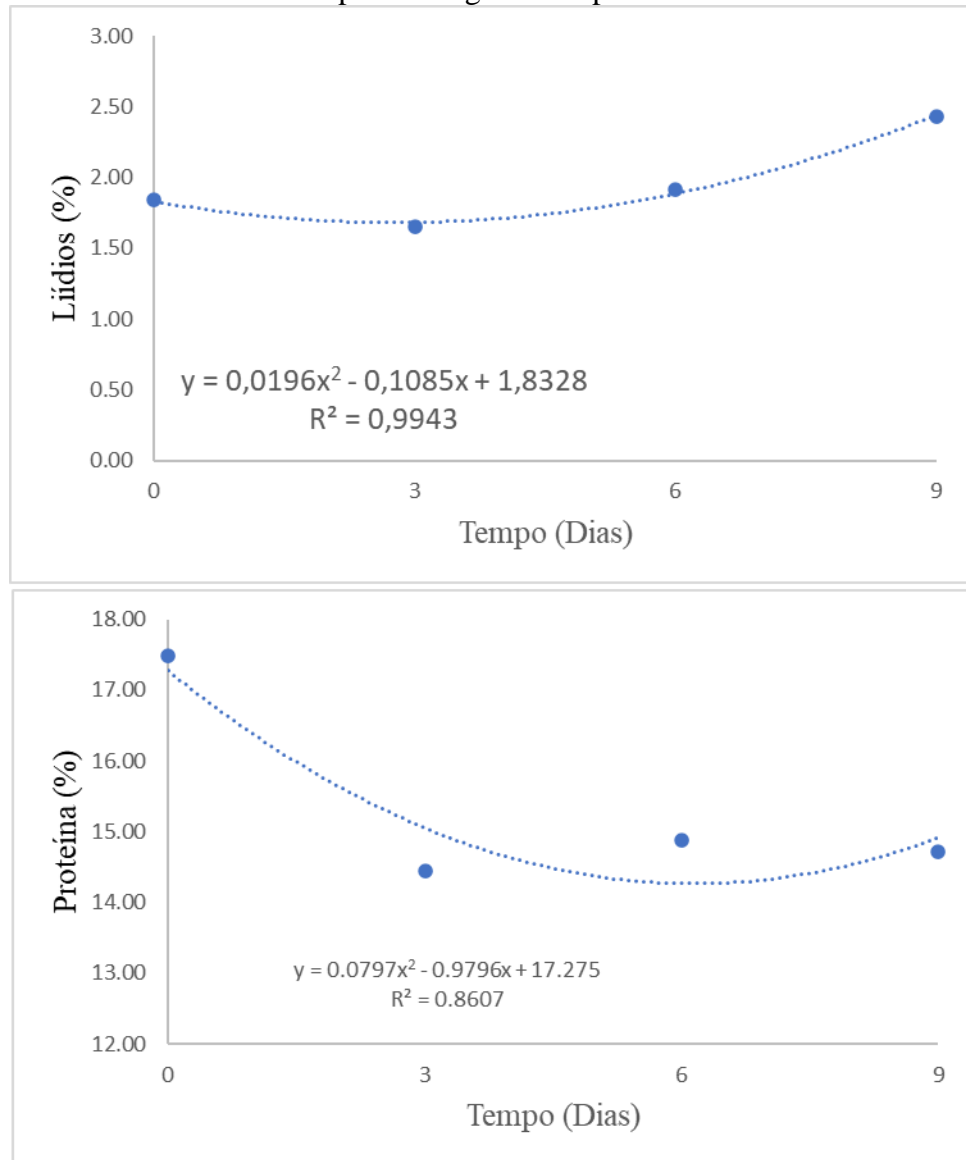
Valores semelhantes foram encontrados por Alsagaf, Moussa & Tayel (2017), Desta et al. (2019), Herath, Haga & Satoh (2016), Jadhav & Anal (2018) e Soccol. Este último autor aplicou banhos em filés de tilápia com água destilada e ácido acético 1% por 2 minutos em temperatura ambiente e não encontrou diferença significativa entre os tratamentos para os mesmos parâmetros analisados. Em trabalho realizado por Fonseca (2013), também não se encontrou variação de umidade e lipídios em filés de tilápia pulverizados com água clorada a 5 ppm e 20 ppm. Entretanto, Oliveira (2008), que utilizou banhos com cloro (3,0 a 3,5 mg/L) e ozônio (3,0 a 3,5 mg/L) a 5 °C por 20 minutos, encontrou diferença para todos os parâmetros dos filés de tilápia analisados.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos nem entre os dias durante a estocagem para os valores de umidade e cinzas, com médias de 76,74 ± 2,38% e 0,99 ± 0,16%,

respectivamente. Os tratamentos também não variaram ( $P>0,05$ ) para lipídios e proteínas, mas durante o tempo de armazenamento os teores de lipídio sofreram uma queda, seguido de aumento até o último dia de análise, enquanto proteína teve queda até o sexto dia e aumento no último dia de análise (Figura 1). O aumento da quantidade de lipídios ao longo dos dias provavelmente está relacionado com a queda da quantidade de proteína ao longo do tempo. Esta também se deve a degradação bacteriana ao longo dos dias de estocagem.

Soccol (2002) aplicou banhos em filés de tilápia com água destilada e ácido acético 1% por 2 minutos em temperatura ambiente e embalou os produtos sob atmosfera modificada por 20 dias, não encontrando diferença significativa entre os tratamentos ao longo do tempo para os mesmos parâmetros analisados. Já o presente trabalho apresentou semelhança com o de Sharifian et al. (2014), em que estudos sobre efeitos da refrigeração em filés de garoupa a 4°C não encontraram diferença significativa nos teores de umidade e cinzas quando armazenados por 14 dias. No entanto, os valores de proteína diminuíram enquanto os de lipídios aumentaram ao longo dos dias de armazenamento. Sousa et al. (2019), em trabalho com filés de tambaqui lavados com água destilada e óleo essencial refrigerados a 10 °C por 14 dias, não encontraram diferença significativa nos valores de umidade e cinzas durante o tempo de estocagem, enquanto os valores de proteína reduziram e os de lipídios aumentaram. Arekemase et al. (2012), em estudos com filés de tilápia lavados com água destilada e refrigerados por 8 semanas a 4 °C com metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio, verificaram queda da proteína e lipídios com aumento da umidade ao longo do tempo de conservação, no entanto os teores de cinzas não foram avaliados nesse trabalho relatado.

Figura 1 – Gráficos e coeficientes de regressão do teor de lipídios e proteínas dos filés de tilápia ao longo do tempo de armazenamento.



Fonte: Do autor (2021).

Os filés estudados no presente trabalho estavam de acordo com a legislação brasileira, sendo que o valor da umidade dividido pelo de proteína para espécie *Oreochromis* foi de 4,36 e não foi superior a 5, conforme determina a Instrução Normativa n° 21, de 31 de maio de 2017, do MAPA (BRASIL, 2017).

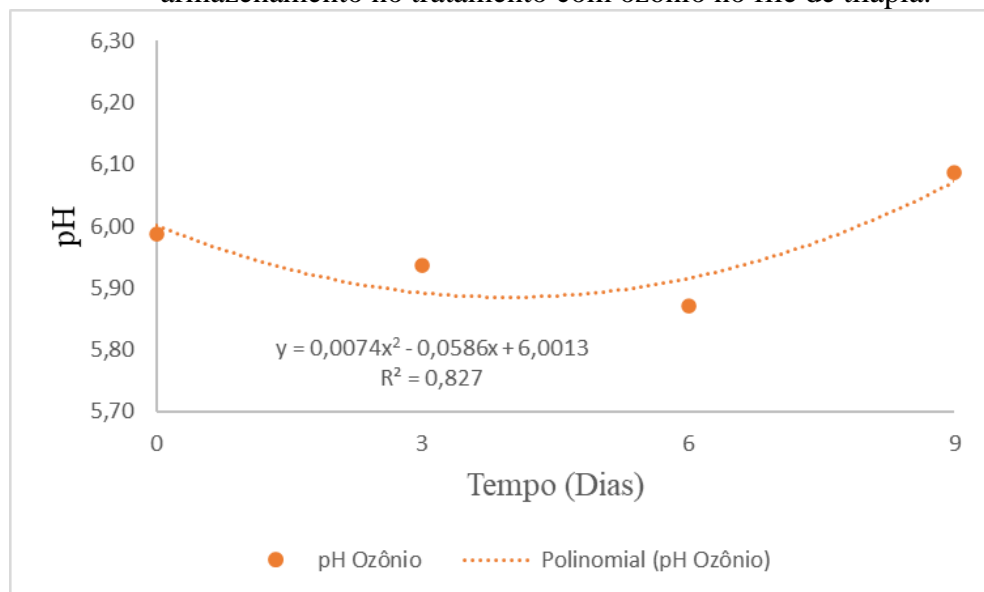
#### 4.2.2. Determinação do pH

Os valores de pH não foram afetados ( $P > 0,05$ ) após a aplicação dos tratamentos; a média observada foi de  $5,94 \pm 0,09$ . Os valores de pH foram menores que os encontrados na literatura,

um dos motivos se deve ao fato dos peixes terem sofrido pouco estresse antes do abate, poupando as reservas de energia, principalmente glicogênio (EMIRE; GEBREMARIAM, 2010). Valores semelhantes de pH em filés de tilápia lavados com água clorada a 5 ppm foram encontrados por Goes et al. (2019), Malik et al. (2021) e Mendonça Silva & Gonçalves (2017). Estes últimos autores encontraram diferença significativa nos valores de pH para filés de tilápia banhados em água ozonizada por 5 minutos em diferentes concentrações, sendo os valores dos tratamentos maiores que o controle, que se apresentou semelhante a este trabalho. Oliveira (2005) também relatou que não houve diferença significativa nos valores de pH entre o controle e tratamento com cloro e ozônio associado ou não ao ultrassom. Tomita et al. (2010), tratando filés de Goete com água ozonizada a 2 ppm e água clorada a 5 ppm por 5 minutos, não encontraram diferença significativa entre os tratamentos pra valores de pH. Zhao et al. (2019) também não observaram diferença entre o tratamento e controle ao banhar filés de tilápia com água ozonizada a 4 ppm por 30 minutos. A lavagem de camarões com água destilada, ozonizada (1 ppm) ou clorada (5 ppm) por 10 minutos também não alterou os valores de pH entre os tratamentos, de acordo com estudo de Gonçalves & Santos (2019).

Durante o tempo de estocagem, os valores de pH só variaram para o tratamento 3 (ozônio), onde houve uma pequena queda progressiva até o sexto dia, com aumento no nono dia, podendo a variação ser descrita por uma regressão quadrática (Figura 2).

Figura 2 – Gráfico e coeficiente de regressão de pH ao longo do tempo de armazenamento no tratamento com ozônio no filé de tilápia.



Fonte: Do autor (2021).

Os demais tratamentos não variaram entre si e nem ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 2). A mensuração do pH em períodos prolongados tende a ser constante (OTANI, 2009), entretanto era esperado um aumento do pH devido a um aumento nas bases



voláteis observadas no presente trabalho, produzidas tanto por enzimas endógenas como microbianas. Contudo, a estabilidade do pH pode estar atribuída ao efeito tampão do músculo do peixe. Este pode ser causado pela presença de proteínas solúveis, peptídeos, aminoácidos, amônia, trimetilamina e substâncias de baixo peso molecular no músculo do pescado, que podem mascarar as mudanças de pH (SOCCOL et al., 2005).

Tabela 2 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de pH dos filés de tilápia submetidos a tratamento ao longo dos dias de armazenamento sob refrigeração.

Tratamentos	pH			
	0	3	6	9
T1	5,96 $\pm$ 0,10 <sup>aA</sup>	5,98 $\pm$ 0,14 <sup>aA</sup>	5,89 $\pm$ 0,13 <sup>aA</sup>	5,98 $\pm$ 0,19 <sup>bA</sup>
T2	5,90 $\pm$ 0,12 <sup>aA</sup>	6,00 $\pm$ 0,12 <sup>aA</sup>	5,91 $\pm$ 0,06 <sup>aA</sup>	5,99 $\pm$ 0,11 <sup>bA</sup>
T3*	5,99 $\pm$ 0,08 <sup>aB</sup>	5,94 $\pm$ 0,13 <sup>aB</sup>	5,87 $\pm$ 0,08 <sup>aB</sup>	6,09 $\pm$ 0,23 <sup>aA</sup>
T4	5,94 $\pm$ 0,07 <sup>aA</sup>	5,99 $\pm$ 0,12 <sup>aA</sup>	5,96 $\pm$ 0,11 <sup>aA</sup>	5,93 $\pm$ 0,14 <sup>bA</sup>

Médias seguidas de mesma letra em minúscula na coluna e em maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Scott Knott, a 5% de significância. T1 – Controle, T2 – Cloro, T3 – Ozônio, T4 – Cloro + Ozônio. \*Efeito quadrático ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Do autor (2021).

A estabilidade do pH durante tempo de armazenamento em filés de tilápia também foram relatadas por Bilbao-Sains et al. (2020), Soccol et al. (2005) e Zhao et al. (2019). A queda do pH nos primeiros dias de análises para o tratamento com ozônio pode estar relacionada com a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) durante a decomposição do ozônio (ZHAO, Y. et al., 2019; ZHAO, Yongqiang et al., 2017), e o seu aumento ao longo do tempo associado a um aumento de bases voláteis produzidas por enzimas endógenas ou microbianas (AREKEMASE et al., 2012; BUDI; THAIB; JULITA, 2019; EMIRE; GEBREMARIAM, 2010; GONÇALVES; SANTOS, 2019; JADHAV; ANAL, 2018; MALIK et al., 2021). O tratamento 4 (ozônio + cloro) provavelmente não obteve os mesmos resultados em relação ao pH devido a ação do ozônio sobre outros compostos como os trihalometanos, que são formados pela reação do cloro sobre a matéria orgânica (VERMA; GUPTA; GUPTA, 2016), levando assim a uma diminuição na formação de  $H_2O_2$ . Os filés de tilápia estavam de acordo com a Instrução Normativa n° 21, de 31 de maio de 2017, do MAPA, cujos valores de pH não devem ser superiores a 7,00 na porção muscular (BRASIL, 2017).

#### 4.2.3. Bases nitrogenadas voláteis totais

Os valores de BNVT apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que a matéria prima (sem tratamento), o T2 (cloro) e o T4 (cloro + ozônio), tiveram valores superiores aos tratamentos T1 (controle) e T3 (ozônio), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (BNVT) dos filés de tilápia nos tratamentos.

<b>Tratamentos</b>	<b>BNVT (g/100g)</b>
Não-tratados (filés antes do tratamento)	11,87 $\pm$ 1,79 <sup>a</sup>
T1 (Controle)	10,48 $\pm$ 2,11 <sup>b</sup>
T2 (Cloro)	12,86 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>
T3 (Ozônio)	11,18 $\pm$ 0,84 <sup>b</sup>
T4 (Cloro + Ozônio)	12,73 $\pm$ 1,14 <sup>a</sup>
Coefficiente de Variação (%)	12,77

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott Knott, a 5% de significância.

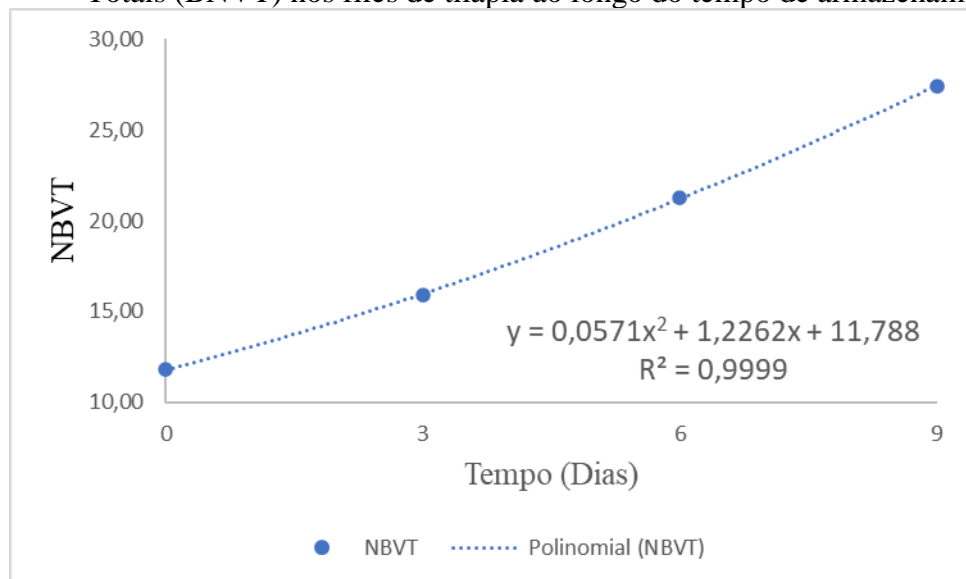
Fonte: Do autor (2021).

Os valores encontrados para o T1 e T3 foram inferiores aos relatados por Zhao et al. (2019), que aplicaram banhos de 4 ppm por 30 minutos em filés de tilápia e os autores também relatam que não houve diferença entre a aplicação de ozônio e o controle. Gonçalves & Santos (2019) também relataram valores menores para ozônio (1 ppm), quando comparado com controle e cloro (5 ppm) no tratamento de camarões. Soccol et al. (2005) e Chuesiang, Sanguandeeikul & Siripatrawan (2020) relataram valores maiores que o apresentando neste trabalho tanto para o grupo controle quando para os tratamentos com cloro. De forma geral, os valores encontrados foram semelhantes aos relatados por Emire & Gebremariam (2010) e Sousa et al. (2019). Os mecanismos de interação dos compostos sanitizantes, como o cloro, com a membrana celular podem ter comprometido a integridade das células e liberados enzimas autógenas, ocasionando um pequeno aumento dos compostos nitrogenados voláteis (OLIVEIRA et al., 2008), como observado em T2 e T4. A redução de compostos voláteis pode estar correlacionada com a lixiviação durante os tratamentos, especialmente se a área exposta for grande, como no caso dos filés (SOCCOL et al., 2005). Isso explicaria o motivo do controle e o ozônio terem resultados inferiores aos filés antes da aplicação de qualquer tratamento (ST).

Ao longo do tempo de armazenamento, os tratamentos não tiveram diferença significativa quando comparados entre si. De forma geral, os valores de BNVT tiveram um efeito quadrático ( $p < 0,05$ ), iniciando com 11,81 g/100g e com aumento dos valores ao longo do tempo (Figura 4), chegando a 27,43 g/100g no nono dia de armazenagem. O mesmo comportamento foi observado em filés de tilápia por Zhao et al. (2019), em seu trabalho o efeito

do ozônio foi superior ao controle ao final de 18 dias de armazenamento. No trabalho de Gonçalves & Santos (2019) o ozônio também foi superior ao controle e ao cloro, que não tiveram diferença significativa, na lavagem de camarão relatada ao final de 12 dias de estocagem. Os dois trabalhos aplicaram tempos superiores de tratamentos em comparação com o presente trabalho. Diferenças significativas entre os controle e cloro também não foram observados ao final de 8 dias de estocagem por Chuesiang, Sanguandeeikul & Siripatrawan (2020) ao usar 10 ppm de cloro por 10 minutos. Comportamento idêntico em filés de tilápia também foram encontrados em outros trabalhos, com aumento de BNVT, que está fortemente associado a degradação de compostos nitrogenados proteicos e não proteicos causada por microrganismos deteriorantes ao longo do tempo de armazenamento (ALSAGGAF; MOUSSA; TAYEL, 2017; BILBAO-SAINZ et al., 2020; BUDI; THAIB; JULITA, 2019; JADHAV; ANAL, 2018; ZHAO, Y. et al., 2019).

Figura 4 – Gráfico e coeficiente de regressão do valor de Bases Nitrogenadas Voláteis Totais (BNVT) nos filés de tilápia ao longo do tempo de armazenamento.



Fonte: Do autor (2021).

No presente trabalho, o aumento de BNVT pode estar relacionado com o aumento da contagem microbiana e diminuição da composição proteica dos filés estudados. Em nenhum momento os filés de tilápia analisados ultrapassaram o valor limite imposto pela Instrução Normativa n° 21, de 31 de maio de 2017, do MAPA, que não deve ser superior a 30 mg/100g de tecido muscular (BRASIL, 2017).

#### 4.2.4. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Houve diferença significativa entre os tratamentos para o índice de TBARS, que indica oxidação lipídica, sendo que o tratamento ozônio (T3) apresentou menores valores quando comparado com os demais (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) dos valores de TBARS dos filés de tilápia nos tratamentos.

<b>Tratamentos</b>	<b>TBARS (mg MDA/Kg)</b>
Não-tratados (filés antes do tratamento)	0,41 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
T1 (Controle)	0,39 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
T2 (Cloro)	0,36 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
T3 (Ozônio)	0,30 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
T4 (Cloro + Ozônio)	0,37 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>
Coefficiente de Variação (%)	12,77

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste Scott Knott, a 5% de significância.

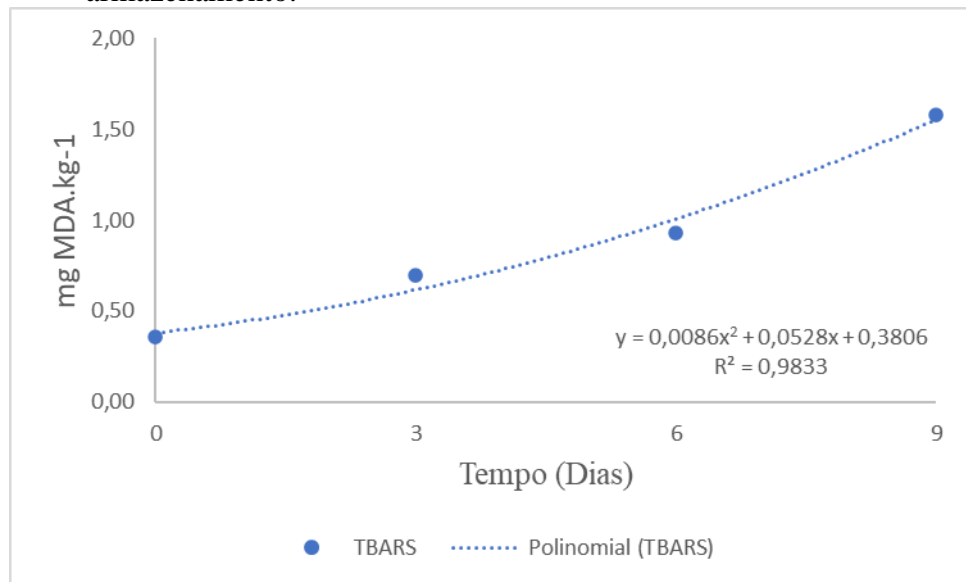
Fonte: Do autor (2021).

Durante o tratamento com água ozonizada, espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser produzidas, acelerando a desnaturação proteica e oxidação lipídica. As ERO atacam os ácidos graxos, principalmente os poli-insaturados, produzindo peróxidos que podem reagir com outras moléculas lipídicas, iniciando um novo ciclo de oxidação (ZHAO, Y. et al., 2019). Entretanto, no presente trabalho, esse efeito inicial sobre os filés de tilápia não foi observado e resultados semelhantes foram encontrados por Kim et al. (2000) e Zhao et al. (2017), os quais verificaram que o ozônio teve valores de mg MDA/Kg menores do que o controle.

Os tratamentos não apresentaram diferença entre si ( $P < 0,05$ ) para os valores de TBARS, mas estes aumentaram ao longo do tempo de armazenamento (Figura 5). Odor característico de ranço podem ser associados a valores superiores de 1,00 mg MDA/kg (TOMITA et al., 2010), que só foi observado no nono dia de armazenamento no presente trabalho. Valores semelhantes em filés de salmão foram observados por Crowe et al. (2012), que não viram diferença significativa entre o tratamento com ozônio e o controle no índice de TBARS. Zhao et al. (2017, 2019) também encontraram valores próximos ao presente trabalho em filés de tilápia tratados com ozônio, entretanto, esses tratamentos geraram mais valores de TBARS do que o controle. Valores diferentes foram encontrados em outros trabalhos (ALSAGGAF; MOUSSA; TAYEL, 2017; CHUESIANG; SANGUANDEEKUL; SIRIPATRAWAN, 2020; JADHAV; ANAL, 2018; OTANI, 2009; SOCCOL et al., 2005) com filé de tilápia, o que se deve provavelmente

às diferentes concentrações lipídicas dos animais estudados, à forma de conservação e à utilização de atmosfera modificada nos produtos durante armazenamento. A ausência de efeito dos sanitizantes sobre o filé pode estar relacionada ao tempo de contato, concentração, temperatura e níveis de pH da solução (GONÇALVES, 2011), sendo talvez o tempo de contato e concentração os prováveis motivos de não haver diferença significativa entre os tratamentos.

Figura 5 – Gráfico e coeficiente de regressão dos valores de Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS) nos filés de tilápia ao longo do tempo de armazenamento.



Fonte: Do autor (2021).

#### 4.2.5. Análise de cor

Os índices de cor luminosidade ( $L^*$ ) e índice de vermelho ( $a^*$ ) após os tratamentos variaram de 41,46 a 43,85 e -1,58 a -1,01 respectivamente, contudo não tiveram diferença significativa ( $P>0,05$ ). Em relação ao índice de amarelo ( $b^*$ ), houve diferença significativa ( $P<0,05$ ), sendo que após os tratamentos, os valores diminuíram quando comparados aos valores observados para a matéria-prima sem tratamento (Tabela 5).

Tabela 5 – Índices de cor CIELAB dos filés de tilápia nos tratamentos.

Tratamentos	$L^*$	$a^*$	$b^*$
Não-tratados (filés antes do tratamento)	41,46 ± 4,59 <sup>a</sup>	-1,01 ± 0,81 <sup>a</sup>	-0,13 ± 1,12 <sup>b</sup>
T1 (Controle)	42,98 ± 3,72 <sup>a</sup>	-1,33 ± 1,53 <sup>a</sup>	-1,09 ± 1,28 <sup>a</sup>
T2 (Cloro)	43,85 ± 2,48 <sup>a</sup>	-1,58 ± 1,38 <sup>a</sup>	-1,43 ± 1,28 <sup>a</sup>
T3 (Ozônio)	42,87 ± 3,47 <sup>a</sup>	-1,08 ± 1,33 <sup>a</sup>	-1,16 ± 1,40 <sup>a</sup>
T4 (Cloro + Ozônio)	42,89 ± 5,16 <sup>a</sup>	-1,38 ± 1,01 <sup>a</sup>	-0,96 ± 1,47 <sup>a</sup>
Coefficiente de Variação (%)	6,85	-56,34	-118,76

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott Knott, a 5% de significância.

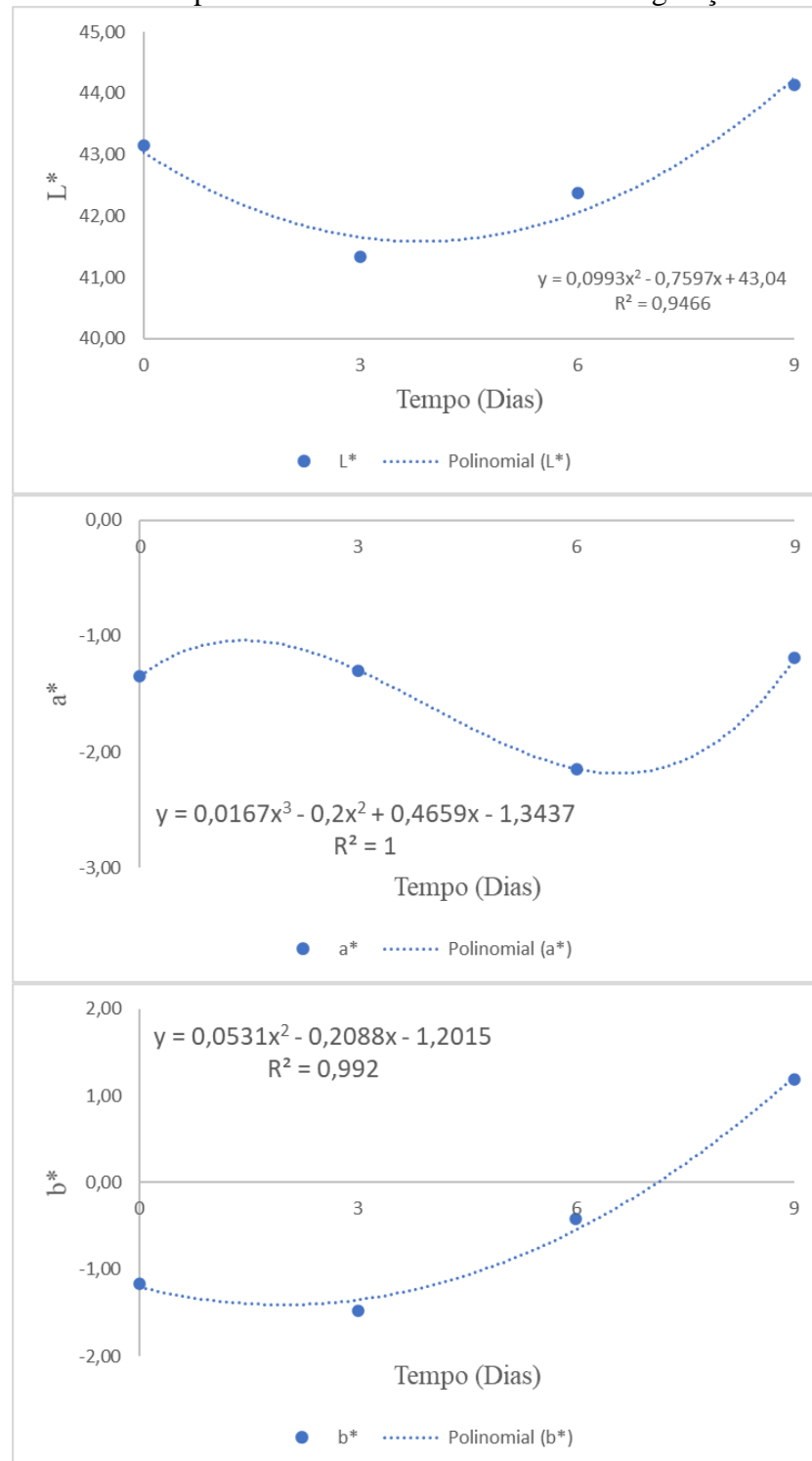
Fonte: Do autor (2021).

De acordo com Mendonça Silva & Gonçalves (2017), os valores de  $b^*$  têm correlação com os pigmentos carotenoides depositados na gordura da carne, os quais provavelmente foram oxidados pelos tratamentos com sanitizantes e afastaram o valor  $b^*$  do amarelo. O tratamento controle (T1) pode ter sido efetivo sobre parâmetro  $b^*$  em função da lixiviação e remoção de componentes que poderiam interferir nessa propriedade (SOCCOL et al., 2005). Em tratamentos com banho de cloro e ozônio, Oliveira (2005) não observou diferença significativa entre os filés de tilápia tratados, Kim et al. (2000) e Mendonça Silva & Gonçalves (2017) relataram diferença apenas no valor de  $b^*$  quando ozônio foi comparado ao controle nos tratamentos de filés de bagre e tilápia, respectivamente.

Nenhum dos tratamentos apresentou diferenças significativas entre si durante o armazenamento refrigerado, que teve valores médios de  $L^*$  42,75 ± 5,12,  $a^*$  -1,49 ± 1,65 e  $b^*$  -0,47 ± 2,59. Houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) ao longo do tempo de estocagem para todos os índices. O índice  $L^*$  reduziu os valores de 43,15 para 41,34 entre o primeiro e o terceiro dia, tendo uma elevação até 44,14 no último dia de estocagem, o parâmetro  $b^*$  iniciou com -1,16, passando para -1,47 no terceiro dia (-1,47) e aumento até atingir 1,18 o nono dia de estocagem, ambos apresentaram um comportamento quadrático ( $P<0,05$ ). O parâmetro  $a^*$

apresentou um comportamento cúbico ( $P < 0,05$ ), no qual o valor inicial foi de -1,34, seguido de duas quedas, -1,30 no terceiro dia e -2,15 no sexto dia, sofrendo aumento com valor de -1,19 no nono dia de estocagem (Figura 6). Os efeitos de aumento de  $L^*$  se assemelham visualmente ao aspecto de músculo cozido, provavelmente por degradação das proteínas (BILBAO-SAINZ et al., 2020). Alterações nos valores de  $a^*$  ao longo do tempo de estocagem podem ter ocorrido devido a alterações nas estruturas dos citocromos e das mioglobinas da musculatura, com sua degradação (MANTILLA et al., 2008). Alterações em  $L^*$  e  $a^*$  podem estar relacionadas com o aumento de contagem microbiana, BNVT e queda do teor de proteínas, ao longo do tempo de armazenamento do presente trabalho. Um aumento gradual no valor  $b^*$  refletindo um aumento do grau de oxidação lipídica com o tempo de armazenamento (ZHAO, Y. et al., 2019), esses valores condizem com o aumento de mg MDA/Kg apresentados. Comportamento semelhante foi observado em filés de tilápia tratados com ozônio por Zhao et al. (2019), os quais verificaram que os valores de  $L^*$  e  $b^*$  aumentaram ao longo do tempo de estocagem, e  $a^*$  teve aumentos e quedas seguidas, com valores abaixo dos iniciais ao final de 18 dias de armazenamento. Em trabalho com filés de salmão, Crowe et al. (2012) relataram diferença no valor  $L^*$  entre tratamentos com várias concentrações de ozônio, os valores de  $a^*$  não diferiam entre tratamentos e ao longo dos dias. Fonseca et al. (2013), em banhos com diferentes concentrações de cloro, relataram variações nos valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ao longo do tempo. Chuesiang, Sanguandeeikul & Siripatrawan (2020) relataram aumento de  $L^*$ , diminuição de  $a^*$  ao aplicar banhos com 10 ppm de cloro em filés de pescado marítimo Perca, os valores de  $b^*$  não se alteraram ao longo dos dias de armazenamento.

Figura 6 – Gráficos e coeficiente de regressão Parâmetro de cor L\* (Luminosidade), a\* (índice de vermelho) e b\* (índice de amarelo) dos filés de tilápia durante armazenamento sob refrigeração.



Fonte: Do autor (2021).



### 4.3. Análises microbiológicas

#### 4.3.1. Mesófilos e Psicotróficos

Os valores para determinação de psicotróficos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Já com relação a enumeração de mesófilos, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), sendo que os tratamentos Cloro (T2) e Cloro + Ozônio (T4) tiveram redução de 0,49 e 0,56 log UFC.g<sup>-1</sup> respectivamente (Tabela 6). Ao contrário do esperado, o ozônio não se mostrou diferente do tratamento controle na redução da contagem de mesófilos, apesar de mostrar uma redução média de 0,26 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Tabela 6 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) da contagem de aeróbios mesófilos e psicotróficos (log UFC.g<sup>-1</sup>) dos filés de tilápia entre cada repetição antes e após cada tratamento.

Tratamentos	Mesófilos (log UFC.g <sup>-1</sup> )	Psicotróficos (log UFC.g <sup>-1</sup> )
Não-tratados (filés antes do tratamento)	4,47 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	4,10 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>
T1 (Controle)	4,46 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	4,23 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>
T2 (Cloro)	3,98 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	4,02 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>
T3 (Ozônio)	4,21 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	3,94 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
T4 (Cloro + Ozônio)	3,91 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	4,04 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott Knott, a 5% de significância.

Fonte: Do autor (2021).

Kim et al (2000), ao usar 5 ppm de água ozonizada por 10 minutos, não encontraram efetividade na redução de psicotróficos, atribuindo isso ao fato de que uma baixa concentração de ozônio é ineficaz para a desinfecção quando em conjunto com matéria orgânica. Luiz et al. (2017) observaram que os tratamentos com concentrações de 0,35 a 9,1 ppm de ozônio em tambaquis inteiros, não foram capazes de inativar *Salmonella typhimurium* previamente inoculada no pescado. Esses autores relataram que o muco característico e outras impurezas naturalmente presentes nas superfícies dos peixes reagem com as moléculas de ozônio, atuando como agentes sequestrantes da molécula de ozônio, diminuindo a disponibilidade desse oxidante no meio. Possivelmente essa justificativa se aplica ao presente trabalho, já que as tilápias e os filés não foram previamente lavados durante seu processamento, levando a uma contaminação cruzada da pele e escamas com o filé, com um possível aumento de substâncias orgânicas impregnadas neles. Somada a instabilidade tanto na fase aquosa quanto gasosa, a meio-vida curta e rápida formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ter contribuído para o baixo ou nulo efeito do ozônio (BRODOWSKA; NOWAK; ŚMIGIELSKI, 2018).

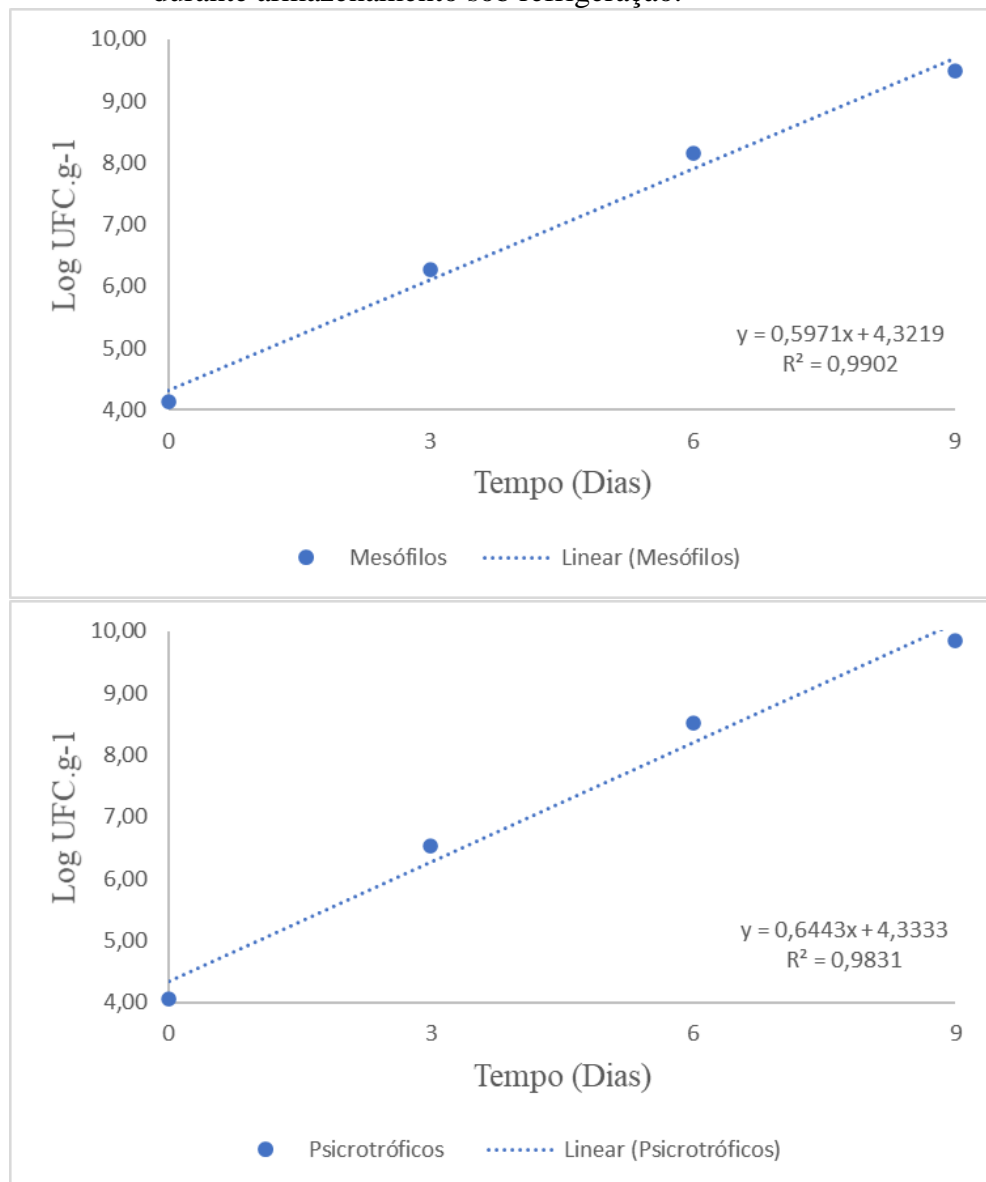
Em contrapartida, trabalhos como Garcia, Mound & Davidson (2003) mostraram em alface, com banhos por 10 minutos, ação sobre mesófilos com redução de 0,6 a 0,8 log UFC.g<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> em concentrações de 5,0 a 7,5 ppm de ozônio, de 0,9 a 1,2 log UFC.g<sup>-1</sup> para concentrações de 100 e 200 ppm de cloro, ação combinada de 7,5 ppm de ozônio com 150 ppm de cloro reduziu 1,4 log UFC.g<sup>-1</sup>, enquanto que a redução mais significativa para psicrotróficos foi com concentração de 7,5 ppm de ozônio. Mendonça Silva & Gonçalves (2017) conseguiram reduzir 79,4% da concentração de mesófilos em filés de tilápia utilizando concentração de 1,5 ppm de ozônio por 15 minutos. Crowe et al. (2012) conseguiram reduzir em filés de salmão 1,17 log UFC.g<sup>-1</sup> de *Listeria innocua* utilizando 1 ppm de água ozonizada associada a aplicação em jatos, verificando que a fricção e o cisalhamento gerados a partir das pulverizações provavelmente contribuíram para melhor efeito antimicrobiano. Skowron et al. (2019), em trabalho com várias cepas de *Listeria monocytogenes*, conseguiram redução de 7,30 a 7,85 log UFC.g<sup>-1</sup> no tratamento de água no uso combinado de cloro 2 ppm e ozônio 2,32 ppm por 5 minutos, comentando que presença de matéria orgânica reduz eficácia dos desinfetantes.

Ao longo do tempo de armazenamento, os tratamentos não se diferenciaram (P>0,05) tanto para mesófilos quanto para psicrotróficos. Entretanto, houve diferença significativa na contagem ao longo dos dias. O aumento do número de UFC com o passar dos dias foram descritas através de regressão linear (P<0,05), em que os valores iniciais de mesófilos e psicrotróficos foram 4,14 e 4,06 log UFC.g<sup>-1</sup>, com valores finais de 9,48 e 9,84 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 7). Essa elevação na contagem era esperada com base nos aumentos de BNVT, TBARS e L\*, juntamente com a redução da quantidade de proteína e do parâmetro b\* e as variações do parâmetro a\* durante os tempos de estocagem.

Normalmente, a contagem bacteriana dos filés de peixe não deve ultrapassar 7 log UFC.g<sup>-1</sup>, acima desse limite o alimento é considerado danoso se consumido, devido às substâncias tóxicas produzidas pela degradação bacteriana que podem causar agravos a saúde (CHUESIANG; SANGUANDEEKUL; SIRIPATRAWAN, 2020). No presente trabalho, esses valores foram superados após o sexto dia de armazenagem sob temperatura de 7 °C, apesar de não ter sido realizada nenhuma análise sensorial, odores característicos da degradação foram observados durante análises laboratoriais dos filés de tilápia. Apesar dos parâmetros de BNVT e pH estarem abaixo do limite estabelecido pela Instrução Normativa n° 21, de 31 de maio de 2017, do MAPA (BRASIL, 2017), não se recomenda o consumo dos filés após o sexto dia, apesar da ausência desse critério na referida instrução normativa. Os critérios microbiológicos da IN n° 21 apenas limitam a presença de *Salmonella* ssp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli*.

Figura 7 – Gráficos e coeficiente de regressão da contagem de aeróbios mesófilos e psicotróficos ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ) dos filés de tilápia durante armazenamento sob refrigeração.



Fonte: Do autor (2021).

Alguns trabalhos verificados na literatura tiveram desempenho parecido com o presente relatado. Kim et al. (2000), ao armazenar filés de bagre em 4°C (5 ppm de água ozonizada por 10 minutos), não verificaram diferença entre o tratamento e controle, encontrando valores similares na contagem de psicotróficos, sendo o limite de 7  $\log \text{UFC.g}^{-1}$  também atingido no sexto dia de armazenamento. Oliveira (2005) observou que, em filés de tilápia, tratamentos com cloro e ozônio com concentrações entre 3,0 e 3,5 ppm por 20 minutos e acondicionados em temperatura de 1,5 °C, demonstraram valores iniciais 3,73 (cloro), 3,51 (ozônio) e 4,10 (controle)  $\log \text{UFC.g}^{-1}$ , próximos ao do presente trabalho. Os tratamentos apresentaram comportamento semelhante ao longo do tempo de estocagem, entretanto, só ultrapassou no 14°

dia valores acima de  $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , provavelmente devido a temperatura de refrigeração dos produtos. Tomita et al. (2010), trabalhando com filés de goete banhados com 2 ppm de ozônio por 5 minutos e 5 ppm de cloro por 1 minuto, encontraram valores iniciais maiores que os relatados neste trabalho, apesar da temperatura de armazenamento ser de  $-0,5$  a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ , os limites para microrganismo foram ultrapassados com apenas três dias de estocagem. A baixa concentração de sanitizante e o tempo de contato com os filés provavelmente favoreceram a maior contagem inicial de mesófilos e psicrotróficos. Crowe et al. (2012), em ambas as concentrações de ozônio (1,0 e 1,5 ppm), ultrapassaram os limites de contagem bacteriana após seis dias de armazenamento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Diferenças entre tratamento e controle ao longo do tempo de estocagem foram observadas por Fonseca et al. (2013) ao tratarem filés de tilápia com cloro a 5 e 20 ppm, armazenados a  $1,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , cujo tratamento com cloro aumentou em dois dias (12 para 14) o tempo de vida útil, quando comparado ao controle. Após isso, os valores de mesófilos e psicrotróficos ultrapassam os limites de  $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ . Zhao et al (2019), após tratamento com 4 ppm de ozônio por 30 minutos em filés de tilápia armazenados em gelo, encontraram superioridade do tratamento sobre o controle ao longo de 18 dias de estocagem, sendo valores acima de  $7 \log \text{UFC.g}^{-1}$  observados apenas no último dia. Em camarões lavados com solução de cloro (5 ppm) e ozônio (1 ppm), por 10 minutos, e armazenados a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 12 dias tiveram tempo de prateleira maior que o grupo controle, o ozônio teve desempenho melhor quando comparado ao cloro segundo Gonçalves & Santos (2019).

## 5. CONCLUSÃO

Os tratamentos cloro e cloro + ozônio tiveram efeito imediato na redução da contagem microbiana total. Os tratamentos com cloro, ozônio e combinados não tiveram efeito diferente do controle ao longo do tempo de refrigeração dos produtos para todos os parâmetros, com exceção do tratamento com ozônio no parâmetro de pH, que não se apresentou estável.

Apenas o cloro e cloro + ozônio mostraram efeito na redução da contagem microbiana inicial, entretanto, os tratamentos não tiveram efeito quando comparados ao controle na promoção da vida útil do produto.

## REFERÊNCIAS

- ALSAGGAF, M. S.; MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A. Application of fungal chitosan incorporated with pomegranate peel extract as edible coating for microbiological, chemical and sensorial quality enhancement of Nile tilapia fillets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 499–505, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.017>>.
- APHA. Standard methods: For the examination of water and waste water. **Analytical Biochemistry**, v. 1, p. 1545, 2017.
- ARAÚJO, D. A. F. V.; SOARES, K. M. P.; GÓIS, V. A. Características gerais, processos de deterioração e conservação do pescado. **Pubvet**, v. 4, 2010.
- AREKEMASE, M. O. et al. Effect of preservatives on proximate composition of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and mackerel (*Scomber scombrus*) during refrigeration storage. **World journal of Biological Research**, v. 5, n. 1, p. 27–40, 2012.
- BILBAO-SAINZ, C. et al. Preservation of Tilapia (*Oreochromis aureus*) Fillet by Isochoric (Constant Volume) Freezing. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 00, n. 00, p. 629–640, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1785602>>.
- BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; AVANCINI, C. A. M. O desinfetante hipoclorito de sódio como barreira sanitária: condições de atividade frente a *Staphylococcus aureus* isolados em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 254–258, 2009.
- BRASIL. **Brasil. Instrução Normativa N° 21, De 31 De Maio De 2017. Diário Oficial da União**. [S.l: s.n.]. , 2017
- BRASIL. **Manual de procedimentos para implantação de estabelecimento industrial de pescado; produtos frescos e congelados**. Brasília, DF: [s.n.], 2007.
- BRASIL. **Portaria 2914/2011 Procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)>. , 2011
- BRASIL. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial da União**. [S.l: s.n.]. , 2020
- BREMER, P. J.; OSBORNE, C. M. Reducing total aerobic counts and *Listeria monocytogenes* on the surface of king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 849–854, 1998.

- BRODOWSKA, A. J.; NOWAK, A.; ŚMIGIELSKI, K. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2176–2201, 2018.
- BUCHAN, K. A. H.; MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; BENFEY, T. J. Measurement of dissolved ozone in sea water: A comparison of methods. **Aquacultural Engineering**, v. 33, n. 3, p. 225–231, 2005.
- BUDI, P. H.; THAIB, E. A.; JULITA, M. Use of Sargassum polycystum ethanol extract as antibacterial for increasing shelf life tilapia fillet (*Oreochromis niloticus*) stored in chilling temperature. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 278, n. 1, 2019.
- CHUESIANG, P.; SANGUANDEEKUL, R.; SIRIPATRAWAN, U. Phase inversion temperature-fabricated cinnamon oil nanoemulsion as a natural preservative for prolonging shelf-life of chilled Asian seabass (*Lates calcarifer*) fillets. **Lwt**, v. 125, n. January, p. 109122, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109122>>.
- CROWE, K. M. et al. Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 464–468, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.021>>.
- DA SILVA, S. B. et al. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 659–682, 2011.
- DE MENDONÇA SILVA, A. M.; GONÇALVES, A. A. Effect of aqueous ozone on microbial and physicochemical quality of Nile tilapia processing. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 6, p. 1–7, 2017.
- DESTA, D. T. et al. Proximate Analysis of Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus*), Fish Fillet Harvested from Farmers Pond and Lake Hawassa, Southern Ethiopia. **International Journal for Research & Development in Technology**, v. 11, n. 1, p. 94–99, 2019.
- EMBRAPA. **Manual técnico de manipulação e conservação de pescado**. [S.l.: s.n.], 2018.
- EMIRE, S. A.; GEBREMARIAM, M. M. Influence of frozen period on the proximate composition and microbiological quality of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 34, n. 4, p. 743–757, 2010.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action**. Rome: [s.n.], 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.4060/ca9229en>>.
- FOGAÇA, F. H. dos S. et al. Métodos para Análise de Pescados. p. 38, 2009.
- FONSECA, G. G. et al. Influence of treatments in the quality of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 246–253, 26 maio 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.33>>.

- FUENTES, M. et al. Microbiota de interés para la salud pública de *Oreochromis* spp. (tilapia roja) cultivada en jaulas flotantes en agua dulce. **Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras**, v. 28, n. 2, p. 74–80, 2011.
- FURLAN et al. **Qualidade e Processamento de Pescado**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- GARCIA, A.; MOUNT, J. R.; DAVIDSON, P. M. Ozone and Chlorine Treatment of Minimally Processed Lettuce. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 9, p. 2747–2751, 2003.
- GOES, E. S. dos R. et al. Imbalance of the redox system and quality of tilapia fillets subjected to pre-slaughter stress. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2019.
- GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011.
- GONÇALVES, A. A.; SANTOS, T. C. L. Improving quality and shelf-life of whole chilled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by ozone technology combined with modified atmosphere packaging. **Lwt**, v. 99, n. October 2017, p. 568–575, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.083>>.
- HELBLING, D. E.; VANBRIESEN, J. M. Free chlorine demand and cell survival of microbial suspensions. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4424–4434, 2007.
- HERATH, S. S.; HAGA, Y.; SATOH, S. Effects of long-term feeding of corn co-product-based diets on growth, fillet color, and fatty acid and amino acid composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 464, p. 205–212, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.032>>.
- IGARASHI, M. A. Aspectos Tecnológicos E Perspectivas De Desenvolvimento Do Cultivo De Tilápia No Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 21, n. 3, p. 123–130, 2019.
- JADHAV, R.; ANAL, A. K. Experimental investigation on biochemical, microbial and sensory properties of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with moringa (*Moringa oleifera*) leaves powder. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 9, p. 3647–3656, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-018-3293-9>>.
- KIM, T. J. et al. Influence of ozone, hydrogen peroxide, or salt on microbial profile, TBARs and color of channel catfish fillets. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1210–1213, 2000.
- LARSEN, A. et al. Diversity of the skin microbiota of fishes: Evidence for host species specificity. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 85, n. 3, p. 483–494, 2013.
- LIMA JUNIOR, E. M. et al. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 193, 2016.
- LUIZ, D. de B. et al. Evaluation of the effectiveness of ozone as a sanitizer for fish



- experimentally contaminated with Salmonella sp. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 0, 2017.
- MACHADO, T. R. M. et al. Avaliação da resistência de Salmonella à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475–481, 2010.
- MALIK, I. A. et al. Effect of frozen storage on the biochemical composition of five commercial freshwater fish species from River Nile, Sudan. **Food Science and Nutrition**, n. April, p. 3758–3767, 2021.
- MANTILLA, D. et al. Carbon monoxide treatments to impart and retain muscle color in tilapia fillets. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, 2008.
- MONTEIRO, M. L. G. et al. Validade comercial de filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) resfriados embalados em atmosfera modificada e irradiados. **Ciencia Rural**, v. 42, n. 4, p. 737–743, 2012.
- MOURA, M. A. M. et al. Caracterização físico-química e de frescor de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) oriundas da pesca extrativista no médio Rio Tietê/SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 3, p. 487–495, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpescas/35\_3\_487-495.pdf%5Cnhttp://producao.usp.br/handle/BDPI/14735>.
- NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of seafood and seafood products analysis**. [S.l: s.n.], 2009.
- OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de Pesca**. [S.l.]: Livraria Varela, 1999. v. 3.
- OLIVEIRA, N. D. M. S. **Ação Sanificante Do Dicloroisocianurato De Sódio , Ozônio E Ultra-Som Em Filés De Ozônio E Ultra-Som Em Filés De**. 2005. Universidade Federal de Lavras, 2005.
- OLIVEIRA, N. de M. S. et al. Avaliação físico-química de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) submetidos à sanitização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 83–89, mar. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S0101-20612008000100013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- OTANI, F. S. **Influência da adição in vivo de vitamina E e de métodos de abate nos atributos de qualidade de filés de tilápia**. 2009. 72 f. Universidade Estadual Paulista, 2009.
- PEDRAZZANI, A. S. et al. Impacto negativo de secção de medula e termonarose no bem-estar e na qualidade da carne da tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 1643–1643, 2009.
- PEIXE BR. **Anuário 2020 Peixe BR da Piscicultura**. . [S.l: s.n.], 2020. Disponível em:

<<https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>>.

RIBEIRO, A. L. M. dos S. et al. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 109–112, 2009.

SALIH, A. M. et al. Modified extraction 2-thiobarbituric acid method for measuring lipid oxidation in poultry. **Poultry science**, v. 66, n. 9, p. 1483–1488, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3382/ps.0661483>>.

SÃO PAULO. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. v. 9.

SCHULTER, E. P.; VIEIRA FILHO, J. E. R. Desenvolvimento E Potencial Da Tilapicultura No Brasil. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 16, n. 2, p. 177–201, 2018.

SHARIFIAN, S. et al. Effects of refrigerated storage on the microstructure and quality of Grouper (*Epinephelus coioides*) fillets. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 929–935, 2014.

SILVA, A. M. de M.; GONÇALVES, A. A. Effect of aqueous ozone on microbial and physicochemical quality of Nile tilapia processing. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 6, p. 1–7, 2017.

SILVA, F. V. et al. Características morfológicas, rendimentos de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias-do-nilo em diferentes faixas de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1407–1412, 2009.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Editora Blucher, 2017.

SKOWRON, K. et al. Biocidal effectiveness of selected disinfectants solutions based on water and ozonated water against *Listeria monocytogenes* strains. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 1–18, 2019.

SOARES, K. M. de P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1–10, 2012.

SOCOL, H. et al. Effects of modified atmosphere and vacuum on the shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. January, p. 7–15, 2005. Disponível em: <[http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Effects+of+Modified+Atmosphere+and+Vacuum+on+the+Shelf+Life+of+Tilapia+\(Oreochromis+niloticus\)+Fillets#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Effects+of+Modified+Atmosphere+and+Vacuum+on+the+Shelf+Life+of+Tilapia+(Oreochromis+niloticus)+Fillets#0)>.

SOCOL, M. C. H. **Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*)**,

- minimamente processada e armazenada sob refrigeração.** 2002. 1–124 f. Universidade de São Paulo, 2002.
- SOUSA, C. L. et al. Avaliação da qualidade microbiológica no processamento de pescados Evaluation of microbiological quality in fish processing industry. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 151–157, 2011.
- SOUSA, A. K. A. de et al. Effect of Alpinia zerumbet essential oil on the shelf life of tambaqui fillets during short-term refrigerator storage. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 2, p. 152–161, 2019.
- TEIXEIRA, L.C.;GARCIA, P. P. C. Qualidade do pescado: captura, conservação e contaminação. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 02, p. 76, 2014.
- TOMITA, R. Y. et al. Utilização do Ozônio como Agente Sanitizante no Processamento do Pescado. **In: 16ª Reunión de la Red Panamericana de Inspección, Control de Calidad y Tecnología de productos Pesqueros - IV Simpósio de Controle de Qualidade do pescado (SIMCOPE)**, p. 1–14, 2010.
- TOMITA, Rúbia Yuri et al. Utilização do ozônio como agente sanitizante no processamento do pescado. 2010, São Paulo: [s.n.], 2010. p. 1–14.
- TONG THI, A. N. et al. Evaluation of the safety and quality of wash water during the batch washing of Pangasius fish (*Pangasius hypophthalmus*) in chlorinated and non-chlorinated water. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 425–431, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.048>>.
- TURRA, E. et al. Uso de medidas morfométricas no melhoramento genético do rendimento de filé da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p. 29–36, 2010.
- UNIFESP. **Tabela de composição química dos alimentos.** Disponível em: <<http://tabnut.dis.epm.br/>>. Acesso em: 1 jun. 2020.
- VERMA, K.; GUPTA, D.; GUPTA, A. B. Optimization of ozone disinfection and its effect on trihalomethanes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 3, p. 3021–3032, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.06.017>>.
- VICENTE, I.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo ( *Oreochromis niloticus* ) no Brasil Prospects of Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus* ) production in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392–398, 2014.
- VIRTO, R. et al. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5022–5028, 2005.
- ZHAO, Y. et al. Effects of Ozonated Water Treatment on Physico-chemical, Microbiological

and Sensory Characteristics Changes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillets during Storage in Ice. **Ozone: Science and Engineering**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2019.

ZHAO, Yongqiang et al. Chemical, Microbiological, Color and Textural Changes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fillets Sterilized by Ozonated Water Pretreatment During Frozen Storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 1, p. 1–9, 2017.