



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE FILÉS DE TILÁPIA ACIDIFICADOS, COZIDOS E ARMAZENADOS À TEMPERATURA AMBIENTE

Daniel Romão **Candido**¹; Marcia Regina Cucatti **Alves**²; Renata **Bromberg**³; Marcia Mayumi
Harada **Haguiwara**⁴; José Ricardo **Gonçalves**⁵

Nº 15232

RESUMO - Filés de tilapia fora de padrão comercial foram acidificados (pH=4,5) embalados a vácuo, cozidos e armazenados à temperatura ambiente para estudar a estabilidade físico-química e microbiológica durante 90 dias à temperatura ambiente. A acidificação foi feita por imersão em solução de ácido láctico (5%) em três proporções entre filé e solução (1:1, 1:2 e 1:3). Foi observado que a queda de pH foi mais rápida na proporção 1:3, levando cerca de 8h. Durante o período de armazenamento as amostras permaneceram comercialmente estéreis e o pH inferior a 4,5 atestando a eficácia do método de preservação.

Palavras-chaves: preservação-método; ácido láctico; redução de pH; embalagem a vácuo.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Química Tecnológica, UNICAMP, Campinas-SP; daniel.romao.candido@gmail.com.

2 Colaborador, Assistente Técnico de Pesquisa do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.

3 Colaborador, Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.

4 Colaborador, Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.

5 Orientador: Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; jricardo@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT- Small tilapia fillets were acidified ($\text{pH} = 4.5$), pre-cooked, vacuum packed, cooked and stored at room temperature to study the physicochemical and microbiological stability for 90 days at room temperature. Acidification was carried out by soaking in lactic acid solution (5%) in three solution: fillet ratios (1: 1, 1: 2 and 1: 3). It was observed that the pH reduction was faster in the 1: 3 ratio, taking approximately 8h. During the storage period the samples remain commercially sterile and the pH below 4.5 attesting the effectiveness of the semi-preserved method.

Key-words: semi-preserved method; lactic acid; pH reduction; vacuum packaging.

1 INTRODUÇÃO

No processo de filetagem há disponibilidade de subprodutos que perdem valor comercial, dentre eles, os filés fora do padrão. A origem está na própria produção do pescado e na filetagem manual. Ainda assim, há alternativas para agregação de valor a esse produto.

Uma técnica muito antiga que pode ser utilizada como parte de um processo de preservação desses filés é a acidificação. Um produto bem conhecido no Brasil é o palmito em salmoura acidificada com ácido cítrico. O leite de coco tipo industrial foi estudado com base nesse princípio (GONÇALVES *et al.*, 1984). Também foram feitas pesquisas sobre semi-conservas de pescado em salmoura acidificada com ácido acético (CARVALHO; LESSI, 1990). A principal função do ácido é inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*, patógeno capaz de produzir toxina em apenas alguns dias em produtos de baixa acidez na temperatura de 22°C (LUND; PECK, 2000). Nesse caso, a legislação norte-americana permite um $\text{pH} \leq 4,6$ (e a brasileira, $\leq 4,5$) para uma acidificação adequada (ALIMENTOS ENLATADOS, 2001). Então, é necessário que o pH recomendado permaneça durante a vida útil do produto e que a penetração da acidez nos tecidos seja a mais breve e uniforme possível.

Outro aliado importante é o processo de pasteurização, cujo objetivo principal é destruir formas menos termorresistentes de patógenos e deterioradores, reduzindo a carga microbiana inicial e, eventualmente, a necessidade de aditivos conservadores.

O efeito conjugado do pH com a pasteurização possibilita a obtenção da estabilidade microbiológica em bases seguras à temperatura ambiente e com expectativa de vida útil de até seis meses, dependendo de outras condições. É uma alternativa viável para o aproveitamento de filés de tilapia fora de padrão comercial com agregação de valor. O uso da refrigeração torna-se dispensável durante o armazenamento, distribuição e comercialização do produto, ampliando as suas chances de consumo em regiões distantes dos grandes centros urbanos.



2 MATERIAL E MÉTODOS

Filés de tilápia fora de padrão comercial foram pré-selecionados e armazenados a -18°C . Antes dos experimentos foram descongelados a $4^{\circ}\text{C}/24\text{ h}$, pesados para cálculo da perda de peso no descongelamento e determinações de pH, composição centesimal, acidez total, cloretos e atividade de água e microbiológicas (clostridio sulfito redutores, *Salmonella* spp, estafilococcus coagulase positiva, coliformes termotolerantes e mesófilos aeróbios). Posteriormente, foram executados ensaios em três etapas: **a)** construção das curvas de acidificação das amostras para a redução de pH até valores inferiores a 4,5 com solução de ácido láctico (5%), definida em ensaios preliminares; **b)** determinação do tempo de imersão em salmoura acidificada (3% de cloreto de sódio refinado e 5% de ácido láctico) para os filés atingirem o $\text{pH} \leq 4,5$ utilizando três proporções peixe:salmoura (P/V): 1:1, 1:2 e 1:3; e **c)** produção de amostras acidificadas na proporção mais adequada (selecionada no item b), pré-cozidas, acondicionadas a vácuo em embalagens plásticas flexíveis, cozidas e mantidas a $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ para avaliação da estabilidade físico-química (pH, acidez total, cloretos e atividade de água) e microbiológica (esterilidade comercial) por até 90 dias, determinadas a cada 30 dias.

2.1 Determinação do pH

Foi determinado nas amostras *in natura*, durante a imersão na salmoura acidificada (item b) e, posteriormente, nas amostras cozidas (item c) utilizando um peagmetro marca Digimed, modelo DM2, com duas casas decimais e eletrodo de penetração introduzido internamente na porção muscular da região lombar (parte com maior espessura da amostra).

2.2. Determinação da composição centesimal

Foram determinados os teores de umidade, proteína-bruta, extrato etéreo e cinzas nas amostras *in natura*, segundo metodologia da AOAC (HORWITZ, 2005).

2.3. Determinação de cloretos

Foi feita inicialmente nas amostras *in natura* e nas amostras acidificadas e cozidas, segundo Ministério da Saúde (BRASIL, 2005).

2.4. Determinação de acidez total

Foi realizada nas amostras *in natura* e nas amostras acidificadas e cozidas, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1999).



2.5. Construção das curvas de acidificação

Filés foram pesados para a obtenção de 50g e acrescidos de 20 mL de água destilada recém fervida com posterior trituração até a obtenção de uma massa homogênea (BRASIL 1999). O pH foi medido (conforme descrito em 2.1) durante a adição da solução 5% de ácido láctico grau alimentício até a amostra atingir $\text{pH} \leq 4,5$. Os ensaios foram feitos em duplicata.

2.6. Perda de peso no descongelamento

Foi determinada pela diferença de peso das amostras congeladas e após o descongelamento, expressando-se o resultado em porcentagem.

2.7. Determinação do tempo de imersão em salmoura acidificada

Foi determinado durante a imersão das amostras na salmoura acidificada até obter o $\text{pH} \leq 4,5$ (medidos conforme 2.1) nas três proporções peixe:salmoura descritas em 2c.

2.8 Pré-cozimento

As amostras acidificadas receberam um pré-cozimento em forno elétrico a 200°C durante 15 minutos para desenvolvimento da cor e textura.

2.9. Método de cozimento

As amostras acidificadas acondicionadas a vácuo em embalagem plástica flexível (polietileno/poliamida) foram cozidas/pasteurizadas em água a 85°C durante 40 minutos e resfriadas em água corrente ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$). No ponto frio das amostras foram introduzidos termopares tipo T acoplados a um registrador de temperatura de precisão ALMEMO (resolução $0,1^{\circ}\text{C}$) pré-calibrado para acompanhamento da temperatura do produto. Termopares também foram colocados na água para monitoramento da temperatura do processo.

2.10. Análises microbiológicas

Foram escolhidas aleatoriamente três amostras *in natura* para a determinação de clostrídios sulfito redutores, mesófilos aeróbios totais e estafilococos coagulase positiva (DOWNES; ITO, 2001). Também foram determinados coliformes termotolerantes/ 45°C (ISO, 2005) e *Salmonella* spp (ISO, 2007). Os filés acidificados, embalados, cozidos e armazenados à temperatura ambiente foram submetidos à análise de esterilidade comercial (FDA, 1998).

Todos os ensaios foram feitos em triplicata (com exceção da curva de acidificação).



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filés descongelados sofreram perda de peso de 2,9%, uma ocorrência natural em operações deste tipo, mas que pode ter impacto econômico em linhas de produção industrial.

A Tabela 1 mostra a caracterização físico-química dos filés utilizados como matéria-prima para processamento. A composição centesimal é similar aos resultados encontrados por Simões *et al.* (2007), ou seja, 16,03; 3,72; 75,71; e 1,11%, respectivamente para proteína, gordura, umidade e cinzas. Diferenças nos teores de gordura e cinzas podem ser típicas de alimentação diferenciada. O pH e teor de cloretos estão próximos dos valores citados por André *et al.* (2014), isto é, 6,3 e 0,08g/100g, respectivamente. O alto valor da atividade de água está associado à perecibilidade da matéria-prima e é típico de alimentos *in natura* (FRAZIER, 2009).

Tabela 1. Composição centesimal e outras determinações em filés de tilápia *in natura*.

Determinações	Resultados
Proteína (g/100g)	18,45 ± 0,37
Gordura total (g/100g)	2,92 ± 0,63
Umidade e substâncias voláteis (g/100g)	78,41 ± 0,38
Cinzas (g/100g)	1,00 ± 0,05
Cloretos (g/100g)	0,10 ± 0,01
Acidez total (g/100g)	0,12 ± 0,02
pH	6,18 ± 0,02
Atividade de água	0,996 ± 0,001

A Tabela 2 mostra resultados da avaliação microbiológica dos filés com destaque para a contagem de mesófilos aeróbios totais. A legislação brasileira não estabelece padrão microbiológico para esta determinação (BRASIL, 2001). Mas, a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*, citada por Soares *et al.* (2011) admite que o limite indicativo de boa qualidade para pescado congelado é 5 log UFC/g e aceitável até 6 log UFC/g, o que enquadra o resultado das amostras como satisfatório neste quesito.

Tabela 2. Análise microbiológica dos filés de tilápia *in natura*.

Determinações	Resultados	Legislação ^A
Clostrídios sulfito redutores (Log UFC/g)	ND	NC
Coliformes termotolerantes (Log NMP/g)	0,92	NC
Estafilococcus coagulase positiva (Log UFC/g)	ND	3
Mesófilos aeróbios totais (Log UFC/g)	5,49	NC
Salmonella spp. (em 25g)	Ausente	Ausência

A: ANVISA, RDC nº12, de 02/01/2001.

ND: não detectado (abaixo do limite inferior do método).

NC: nada consta na legislação.

A Figura 3 mostra que duas amostras dos filés *in natura* com pH inicial muito próximos comportaram-se de maneira quase idêntica. O trecho inicial das curvas tem uma inclinação maior em relação ao eixo horizontal, significando que o consumo de ácido láctico é proporcionalmente menor para a faixa inicial de pH. Isso se deve ao poder tamponante da amostra, fato que também foi observado em estudos similares com palmito e leite de coco (ZAPATA;QUAST, 1975; GONÇALVES *et al.*, 1984). Para atingir o pH=4,5 foram necessários cerca de 0,80g de ácido láctico para cada 100g de amostra. Em caso de processamento é recomendável adotar um pH ligeiramente inferior como margem de segurança.

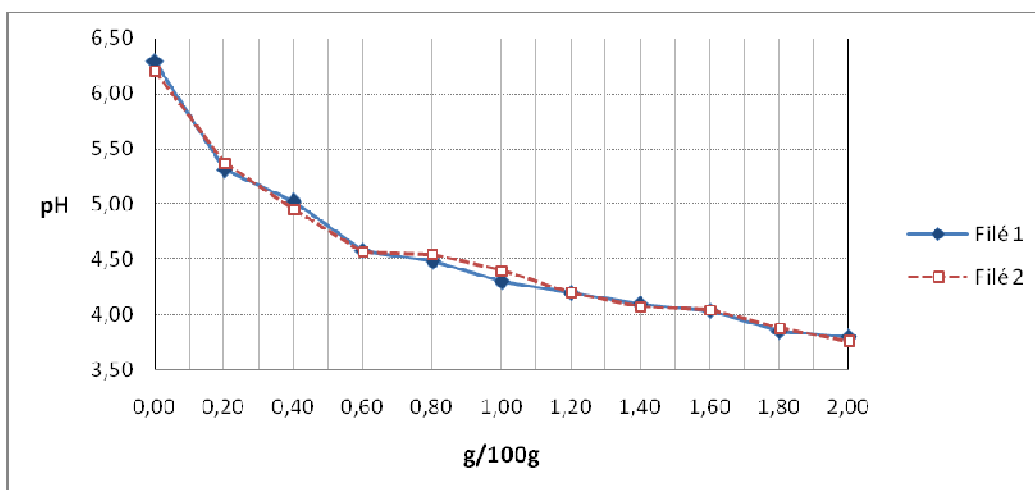
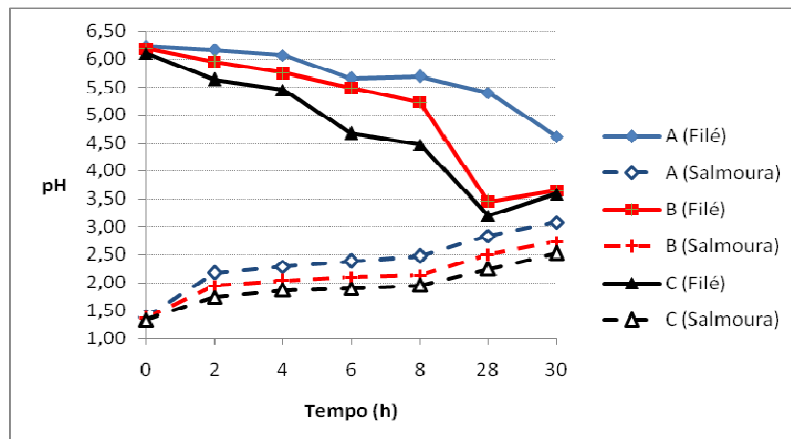


Figura 3. Curvas de acidificação de filés de tilápia *in natura* com solução 5% de ácido láctico (em gramas de ácido por 100 gramas de amostra).

Na Figura 4 observa-se que à medida que o volume de salmoura é proporcionalmente maior, o pH das amostras é reduzido em menor tempo de imersão, embora a concentração inicial da salmoura seja igual para os três tratamentos. Conforme relatado por Capaccioni *et al.*, (2011) esse é um dos métodos utilizados para agilizar a queda de pH. Então, no aspecto de segurança microbiológica, o tratamento C (proporção 1filé:3 salmoura) seria o mais indicado na prevenção contra a produção de toxinas pelo *Clostridium botulinum*, atingindo internamente o pH=4,5 em cerca de 8 horas de imersão. Como na superfície das amostras é provável que o pH esteja mais próximo do pH da salmoura (2,0) foi estabelecido um período de 40h de descanso para melhorar a distribuição da acidez antes de realizar a pré-cozão e dar prosseguimento ao experimento.



A-Proporção 1filé:1 salmoura (P/V)
B-Proporção 1filé:2 salmoura (P/V)
C-Proporção 1filé:3 salmoura (P/V)

Figura 4. Comportamento do pH em função da proporção entre amostra e salmoura acidificada durante o tempo de imersão (em horas).

Na Tabela 3 nota-se que, em geral, os valores apresentados são relativamente estáveis, podendo-se atribuir as diferenças a variações na uniformidade das amostras, as quais foram consideradas comercialmente estéreis. Os valores de pH mantiveram-se inferiores a 4,5 e são capazes de inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*.

Tabela 3. Determinações em filés de tilápia acidificados, embalados a vácuo, cozidos e armazenados à temperatura ambiente.

Tempo (dias)	Aw	pH	Cloretos (%)	Acidez (%)
01	0,973±0,001	3,89±0,06	1,61±0,08	0,45±0,06
30	0,975±0,002	3,65±0,06	1,53±0,08	0,44±0,26
60	0,970±0,002	3,49±0,02	1,51±0,10	0,53±0,17
90	0,971±0,003	3,48±0,03	1,56±0,11	0,43±0,17

4 CONCLUSÃO

O filé de tilápia é uma matéria-prima de baixo teor de gordura e alto teor de proteína, mas dependente de processos de higiene em razão da elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade. A acidificação com ácido láctico seguida de cozimento em embalagem a vácuo mostrou eficácia como método de preservação por, ao menos, 90 dias à temperatura ambiente.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIMENTOS ENLATADOS. **Princípios de Controle do Processo Térmico, Acidificação e Avaliação do Fechamento de Recipientes**. The Food Processors Institute. 5th edition. 4ª edição traduzido pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 2001.

ANDRÉ, T.; ANDRADE, J. C.; HAGUIWARA, M. M.; H; HASHIMOTO, J. M.; GONÇALVES, J. R. **Aproveitamento de aparas da filetagem de tilapia para o desenvolvimento de produto em conserva**. In: 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica. Anais. 2014. Campinas-SP, 12 a 14 de agosto.

BRASIL. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. ANEXO. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/instnorm20.html>. Acesso em setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos físico-químicos para análises de alimentos/Instituto Adolfo Lutz. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 4ª Edição. Pág. 112-113.

CAPACCIONI, M. E.; CASALES, M. R.; YEANNES, M. I. **Acid and salt uptake during the marinating process of *Engraulis anchoita* filets influence of the solution: fish ratio and agitation**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 31(4): 884-890, out.-dez. 2011.

CARVALHO, N. L.A.; LESSI, E. **Elaboração de uma Semi-Conserva de Pescado de Água Doce "Picles de Peixe". I. Tempo de Cura, Acidificação, Textura e Nivel de Sal**. ACTA AMAZONICA, 20 (único):321-329. 1990.

FRAZIER, R. A. **Food chemistry**. In: CAMPBELL-PLATT, G.(ed.). Food Science and Technology. Blackwell Publishing Ltd, Singapore. Chapter 2, 2009.

DOWNES, F. P.; ITO, K. (ED.) **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 4th edition. Washington: American Public Health Association, 2001.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Bacteriological Analytical Manual**. 8th ed. Revision A. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, VA, USA, 1998.

GONÇALVES, J.R., TEIXEIRA NETO: LEITÃO, M.F.F. **Aspectos Preliminares na Conservação do Leite de Coco Tipo Industrial por Acidificação e Pasteurização**. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 21(4):489-502, out./dez.1984.

HORWITZ (ed.) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis of AOAC international**. 18 ed.Washington: Gaithersburg, Maryland, AOAC International, 2005.

ISO 7251 –International Organization for Standardization. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique*, 2005.

ISO 6597- International Organization for Standardization. *Microbiology of food animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* sp.*, 2007.

LUND, B.M.; PECK, M. W. **Evaluation on the Risk of Growth and Toxin Production by *Clostridium botulinum* in Selected New Products of Concern**. Conely, Norwich: Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, Institute of Food Research, Norwich Research Park, 2000. 60p.

SIMÕES, M.R; RIBEIRO; C. F. A; RIBEIRO, S.C.A; PARK, K; MURR, F. E. X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilapia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(3): 608-613, jul.-set. 2007.

SOARES, V. M.; PEREIRA, T. B. I.; MARTINS, O. A.; PINTO, J. P. A. N.; BIONDI, G. F. **Qualidade Microbiológica de Filés de Peixe Congelados Distribuídos na Cidade de Botucatu**. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde 2011;13(2):85-8. 85.

ZAPATA, M. M.; QUAST, D. G. Curvas de titulação do palmito-doce (*Euterpe edulis* Mart.). Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 6, p. 167-187, 1975.