

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA
E NUTRICIONAL DA SILAGEM BIOLÓGICA DE
RESÍDUOS DE PESCADO PARA USO
EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Norival Ferreira dos Santos

Fortaleza – Ceará

2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
NUTRICIONAL DA SILAGEM BIOLÓGICA DE RESÍDUOS DE
PESCADO PARA USO EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Norival Ferreira dos Santos

Fortaleza – Ceará
2000

PROCESSAMENTO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E NUTRICIONAL
DA SILAGEM BIOLÓGICA DE RESÍDUOS DE PESCADO PARA USO
EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ COMO UM DOS
REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Norival Ferreira dos Santos

Fortaleza – Ceará
2000

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho dessa dissertação será permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Norival Ferreira dos Santos

Dissertação aprovada em: ____/____/____

Prof. Dr. Ronaldo de Oliveira Sales
Orientador

Profa. Dra, Elisabeth Mary Cunha da Silva

Prof. Dr, Geraldo Arraes Maia

*“Para triunfar é necessário vencer,
para vencer é necessário lutar,
para lutar é necessário estar preparado,
para estar preparado é necessário prover-se de uma
grande inteireza de ânimo e de uma paciência a toda
prova.*

*Isto requer, por sua vez, levar constantemente ao íntimo da
vida o incentivo da suprema esperança de alcançar aquilo
que se quer como culminação feliz da existência”.*

Da Sabedoria Logosófica

A Deus, supremo e único orientador de minha vida.

À minha mãe Rosária por segurar minha mão em todos os meus passos, dando-me amor e segurança.

À minha tia Laura, por seu carinho e cuidados.

A meu pai, José Rodrigues (*in memoriam*) e ao meu único irmão Nilson (*in memoriam*), por serem espíritos que me iluminam.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa Científica (FUNCAP) pela concessão de bolsa de estudo, em especial ao Dr. Jader Onofre de Moraes.

Ao orientador Prof. Dr. Ronaldo de Oliveira Sales pelas observações sugeridas no decorrer deste trabalho e, principalmente, por seu empenho na aquisição da bolsa de estudo.

A Profa. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva por toda sua orientação, dedicação e acima de tudo sua imensa amizade.

Ao Prof. Dr. Geraldo Arraes Maia pelo incentivo e apoio no decorrer deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos por suas valiosas contribuições na realização deste trabalho, e em particular, aos professores Cals, Telles e Regine.

A todos os que compõem o Laboratório de Processamento de Carnes e Pescado, em especial aos funcionários Luiz Bitu, Rose e Valdenira, pela valiosa ajuda e amizade.

Ao professor Renato de Azevedo Moreira, do Departamento de Bioquímica e a Ana Cristina de Oliveira Monteiro, pela prestimosa colaboração nas análises e cálculos dos aminoácidos.

Ao PADETEC, na pessoa do Prof. Afrânio Craveiro, da Dra. Iracema e do funcionário Ricardo, pela contribuição na realização das análises de ácidos graxos.

Ao técnico Valderéz do Departamento de Solos pela análise dos minerais.

Ao Prof. Ediberto da Química Orgânica pela ajuda na interpretação dos resultados do cromatograma de ácidos graxos.

Aos técnicos Fernando, Sônia e Isabel pela colaboração no ensaio biológico e, ao Biotério Central da UFC pela doação dos ratos utilizados no experimento.

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC pela estrutura física concedida para a montagem do ensaio biológico.

Especial agradecimento a Dra. Artamizia, chefe do Biotério de Experimentação Animal, por sua valiosa contribuição e orientação no decorrer do ensaio e, aos funcionários, Antônio e ao Sr. Bento.

A Dra. Cláudia de Ó Pessoa, e ao Doutor Odorico pelo apoio oferecido junto ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC.

As empresas NUTERAL (Dr. Augusto Guimarães), BLANVER e DISPA (Sr. Lodo) pela doação de ingredientes para a formulação de dietas experimentais.

A Camocim Pesca pela doação dos resíduos de pescado, os quais contribuíram para a elaboração das silagens.

Ao Prof. e Coordenador do Laboratório de Estatística e Matemática (LEMA), Dr. Vicente, pela valiosa contribuição na realização da análise estatística.

Aos companheiros do Mestrado, Oscarina, Célia, Huston, Eroteíde e Sylvia Mafra, Suzy, Auricélia pelas horas de alegrias e angústias compartilhadas no decorrer do Curso.

Aos amigos do Ministério da Agricultura pelo incentivo e aprendizado na área de Tecnologia de Pescado, especialmente, ao Dr. Francisco das Chagas Silva.

Ao grande amigo e irmão, Prof. Eudênio Bezerra, pela revisão ortográfica e sugestões dadas na composição da dissertação.

A Profa. Neide Fernandes, pelo encorajamento e decisão na hora de optar pela realização do Mestrado.

A Dra. Nívea Ginez pela amizade e contínuo estímulo profissional.

Ao meu cachorro Tom, pela sua companhia nas horas de estudo e pelas suas brincadeiras, que me faziam esquecer o cansaço e aliviar o estresse.

Aos amigos, Lenize, Júnior, Pedro Rabêlo e Fernando pelo companheirismo e amizade de todas as horas.

Finalmente, gostaria de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Elaboraram-se duas silagens A e B por método biológico com composição e formulação idênticas, porém, em tempos diferentes. Utilizaram-se 56% de resíduos de pescado de águas marinhas, 30% de farinha de trigo como fonte de carboidrato, 10% de fermento biológico e 4% de sal. Após total homogeneização a biomassa permaneceu 06 dias em condição de anaerobiose até estabilização do pH em 4,5. Ao final desta fase, constituía-se a silagem biológica úmida, a qual foi exposta ao sol à temperatura de $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24 horas descontínuas, até secagem total.

As determinações da composição centesimal realizada durante as fases – resíduo, silagem úmida, silagem seca, apresentaram-se satisfatórias, principalmente no produto seco, por haver alta concentração de nutrientes. Quando a silagem seca A estava com 90 dias de elaboração a silagem B, atingia os 30 dias de processamento. A composição centesimal de ambas, apresentaram-se bastante semelhantes e de valor calórico muito próximos.

Quando à caracterização nutricional, pode-se observar que pequenas variações ocorreram nos teores dos minerais, aminoácidos e ácidos graxos, quando a silagem A foi comparada a silagem B. O padrão microbiológico das silagens A e B apresentou reduzido números de bactérias e ausência de microrganismos patógenos estando dessa forma o produto apto para o consumo animal.

Após padronização de dietas – proteína (caseinato de cálcio), silagem A (90 dias), Silagem B (30dias), ração comercial e ração aprotéica – um ensaio biológico foi realizado, utilizando ratos da linhagem Wistar em 5 grupos homogêneos contendo em cada, 8 animais. Os resultados obtidos do ensaio biológico demonstraram que a silagem B (30 dias) foi superior à silagem A (90 dias) quanto ao ganho de peso, ingestão de dieta e coeficiente de eficiência protéica, sendo dessa maneira, aconselhável o uso da Silagem B, como ingrediente para ração animal.

ABSTRACT

Two ensilages A and the B for biological method with identical composition and formularization had been elaborated, however, in different times. 56% of residues had been used of fished of sea waters, 30% of wheat flour as carbohydrate source, 10% of biological ferment and 4% of salt. After total homogenization the biomass remained 06 days in condition of anaerobiosis until stabilzation of the pH in 4,5. To the end of this phase, the humid biological ensilage was established, which was displayed to the sun to the temperature of $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$ for 24 discontinuous hours, until total drying. The determination of the centesimal composition carried through during the phases – residue, humid ensilage, dry ensilage, had been presented satisfactory, mainly in the dry product, for having high concentration of nutrients. When the dry ensilage A was with 90 days of elaboration the ensilage B, reached the 30 days of processing. The centesimais compositions of both had presented sufficiently similar and of very next value caloric. In relation to nutritional characterization, the ensilage can be observed that small variations had occurred in texts of minerals, aminoacids, and greasy acids, when the ensilage A was compared with the ensilage B. The microbiological standard of the ensilages A and B presented reduced numbers of bacteria and absence of pathogenic microorganisms, being of this form the apt product for the animal consumption. After standardization of diets After standardization of diets – proteic (caseinato of calcium), ensilage A (90 days), ensilage B (30 days), commercial ration and aroteic ration – a biological assay was carried through, using rats of the Wistar ancestry in 5 homogeneous groups containing in each, 8 animais. The gotten results of the biological assay had demonstrated that ensilage B (30 days) was superior to the ensilage A (90 days) in relation to the profit of weight, ingestion of diet and coefficient of proteic efficiency, being in this way, advisable the use of the ensilabe B, as ingredient for animal ration.

SUMÁRIO

	página
RESUMO	
ABSTRACT	
RELAÇÃO DE TABELAS	
RELAÇÃO DE FIGURAS	
RELAÇÃO DE GRÁFICOS	
1. INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Histórico	21
2.2 Definições	23
2.3 Métodos de processamento para obtenção de silagem	23
2.3.1 Método ácido	24
2.3.2 Método biológico	27
2.4 Composição química do pescado	30
2.5 Composição química da silagem	31
2.5.1 Proteínas e aminoácidos	32
2.5.1.1 Proteínas	32
2.5.1.2 Aminoácidos	33
2.5.2 Ácidos graxos	34
2.5.3 Minerais	35
2.6 A silagem de pescado e seu valor nutricional	37

3.	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Matéria-prima	40
3.2	Preparação do fermento biológico	40
3.3	Obtenção da silagem biológica	42
3.4	Secagem e estocagem da silagem	45
3.5	Determinações analíticas	47
3.5.1	Composição centesimal	47
3.5.2	Análises físico-químicas	47
3.5.3	Caracterização nutricional	48
3.5.3.1	Determinação de minerais	48
3.5.3.2	Determinação de aminoácidos	48
3.5.3.3	Obtenção dos ésteres metílicos	49
3.5.3.3.1	Condições cromatográficas	50
3.6	Análise microbiológica	51
3.7	Ensaio biológico	51
3.7.1	Ingredientes	51
3.7.2	Animais	52
3.7.3	Formulação das dietas	52
3.7.4	Procedimentos de ensaio	52
3.7.5	Delineamento Estatístico	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Rendimento	55
4.4.1	pH – fermento biológico	58
4.4.2	pH – silagem biológica	59

4.4.3	Acidez expressa em ácido láctico	60
4.5	Caracterização nutricional	61
4.5.1	Perfil de minerais	61
4.5.2	Perfil de aminoácidos	61
4.5.3	Perfil de ácidos graxos	64
4.6	Análise microbiológica	66
4.7	Ensaio biológico	67
5.	CONCLUSÕES	71
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELAS		páginas
01	Formulação básica para o preparo das dietas utilizadas no ensaio biológico	52
02	Características organolépticas da silagem biológica úmida de resíduos de pescado	55
03	Composição centesimal da silagem biológica de resíduos de Pescado durante as fases de processamento (Silagem A) ...	56
04	Composição centesimal da silagem biológica de resíduos de pescado durante as fases de processamento (Silagem B)	57
05	Composição mineral das silagens biológicas de resíduos de pescado A e B	60
06	Aminoácidos (g/100g de proteína) das silagens biológicas de resíduos de pescados com 90 dias (Silagem A) e dais (Silagem B) de elaboração	62
07	Aminoácidos essenciais contidos nas silagens biológicas de resíduos de pescado, A (90 dias) e B (30 dias) comparados com o padrão FAO, em g/100 de proteína	63
08	Valores obtidos das composições químicas das frações lipídicas das silagens A e B	65
09	Contagem Padrão em Placas (CPP) de bactérias, Número Mais Provável (NMP) de Coliforme Totais e Fecais, pesquisa para <i>Staphylococcus aureus</i> e pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. em amostra de silagem biológica de resíduos de pescado com 90 e 30 dias de processamento ...	66
10	Médias de ganho de peso, Ingestão da dieta, e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) da proteína para as dietas experimentais dos diferentes tratamentos	68

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURAS		páginas
01	Fluxograma das etapas de formulação do fermento biológico	41
02	Fluxograma das etapas de obtenção da silagem biológica de resíduos de pescado.....	43
03	Fermento biológico	44
04	Resíduo de pescado triturado	44
05	Silagem biológica	46
06	Silagem biológica seca	46
07	Dieta peletizada	53
08	Ensaio biológica	53

RELAÇÃO DE GRÁFICOS

GRÁFICOS		páginas
01	Variação do pH durante a preparação do fermento biológico	59
02	Evolução de Ganho de Peso durante o ensaio biológico	69

1 - INTRODUÇÃO

A produção de resíduos faz parte da rotina diária das indústrias alimentícias, principalmente a pesqueira. Cada vez que essa indústria beneficia um produto está também gerando sobras e/ou subprodutos dos alimentos. Tais sobras são de valor relativamente baixo.

Os resíduos da industrialização do pescado representam um sério problema para a indústria, por serem poluentes e de difícil descarte, interferindo nos custos e na eficiência de produção (MORALES-ULLOA & OETTERER, 1995).

Os resíduos sólidos gerados por indústrias processadoras de pescado, exceto as produtoras de farinha de pescado, eqüivalem de 30 a 80% do pescado desembarcado, dependendo de cada operação. A indústria de camarão produz 40 a 80% de resíduos, seja a retirada da cabeça feita a bordo ou na indústria. As indústrias filetadoras de pescado produzem 30 a 60% de resíduos e a de caranguejos 75 a 85%. As indústrias de farinha de pescado geram poucos resíduos, porém, o investimento em tecnologia e combustíveis é alto. (LUSTOSA NETO, 1994).

O gerenciamento destes resíduos é hoje um dos principais problemas ambientais vivenciados pelas empresas de industrialização de pescado. Com a aprovação da Lei Federal contra Crimes Ambientais 9605 de 12 de fevereiro de 1998, a qual estabelece pesadas sanções para os responsáveis pela disposição inadequada de resíduos, faz-se necessário desenvolver o uso de tecnologias que possam reaproveitar resíduos, transformando-os em produtos de utilização benéfica ao meio ambiente e, conseqüentemente, ao homem.

A bioconversão do material residual, com conseqüente aproveitamento deste, trará vantagens econômicas para a indústria, além de sanar o grande problema de eliminação de resíduos.

Para a United Nation Industrial Development Organization (UNITED,1991) a recuperação e a utilização de resíduos, tanto sólidos quanto líquidos, de pescado marinho pode ser uma medida segura de proteção ao meio ambiente e à indústria pois, para serem descarregados junto à água, após tratamento, há dificuldades decorrentes do grande volume, alta demanda biológica de oxigênio - DBO, dos sólidos em suspensão e dos altos níveis de gordura e proteína. Assim, a UNIDO realizou um amplo estudo com informações técnicas e custos relativos ao gerenciamento dos resíduos da indústria processadora de pescado. Várias opções são discutidas, como as produções de ração, silagem e “minced” – triturado de músculo de pescado. É sugerida a produção de silagem em partidas de 50kg ou em tanques de 1t ou mais, adicionada de carboidratos como o melaço, como substituto das farinhas de peixes.

A necessidade de se montar sistemas de aproveitamento dos resíduos das indústrias é de ordem econômica e de conservação de energia. Pode-se pensar desde um maior uso da matéria-prima até o produto final, ou ainda, o desenvolvimento de novos produtos que utilizem resíduos líquidos e sólidos no preparo. Para o aproveitamento destes resíduos as ferramentas mais úteis são as enzimas e os microrganismos (SHOEMAKER, 1986).

A maioria das tecnologias recomendada para a utilização dos resíduos das indústrias de pescado inclui investimentos iniciais importantes e não são economicamente viáveis. Os aterros sanitários e as lagoas de tratamentos de efluentes também não são alternativas viáveis em virtude da contaminação odorífica que provocam nas áreas costeiras ou de águas doces, geralmente associadas com pólos de lazer. A silagem de pescado e a compostagem com outros materiais ou resíduos industriais e a produção de subprodutos de alto valor

comercial podem ser uma alternativa para este problema. (LUSTOSA NETO, 1994).

Os resíduos de origem animal representam uma vasta fonte de energia e nutrientes que podem ser reciclados pelo uso de processos de bioconversão. A produção de biomassa permite a elaboração de produtos de maior digestibilidade. Muitas das sobras atualmente descartadas pela indústria tem um bom mercado, pois representam um rico material alimentício quando recuperado adequadamente (LISTON, 1977; MORAIS & MARTIN, 1981; TENUTA FILHO, 1983; SEAL, 1992.).

A produção de novos alimentos ou nutrientes tendo como matéria-prima o material residual às vezes torna-se inviável devido o elevado nível de investimento para a implantação das unidades produtivas tradicionais. No entanto, o desenvolvimento da biotecnologia permite mais facilidade de utilização de enzimas e microrganismos adaptados para degradar biomassa e assim, processos modernos permitirão o manejo do resíduo com fluxo contínuo e com menos investimento (OETTERER, 1993).

Os resíduos da industrialização do pescado podem ser dirigidos para vários tipos de aproveitamento e divididos em 04 categorias: alimentos para consumo humano, ração para animais, fertilizantes e produtos químicos. A maioria se destina à produção de farinha, porém, para que seja economicamente viável, a quantidade mínima é de 10t/dia. A utilização do resíduo da filetagem caracteriza o aproveitamento na forma de “minced” e pode alcançar o maior preço dos produtos reciclados; é útil em países com problemas de desnutrição e origina vários outros produtos como o “surimi” e o “kamaboko”. O preparo da silagem a partir de resíduo sólido de pescado necessita de um único capital de investimento, de recipientes de preparo e de estocagem (UNITED, 1991).

A farinha de peixe é a fonte protéica de origem animal mais abundante para a manufatura de ração para animais domésticos. Em 1990, 86% da produção mundial, foram destinados à elaboração de rações para animais aquáticos. A

escassez dessas rações no mercado mundial cria a expectativa do surgimento de um substituto para a farinha de peixe, que seja adequado quanto aos aspectos nutricionais e de custo (NOGUEIRA JÚNIOR *et al.*, 1997). As vantagens da produção da silagem em vez da farinha do pescado são as seguintes: o processo é virtualmente independente de escala; a tecnologia é simples; o capital necessário é pequeno mesmo para produção em larga escala; os efluentes e problemas com o odor são reduzidos; o processo de ensilagem é rápido em climas tropicais e o produto pode ser utilizado no local. A única desvantagem está no volume obtido quando o produto apresenta-se na forma pastosa, o que pode ser compensado com a utilização do mesmo desidratado, utilizado como ingrediente de rações. Tal desidratação pode envolver custo adicional da silagem se utilizar equipamentos específicos (KOMPIANG, 1981).

O Programa para Rações Alternativas tem investigado o uso dessas silagens e os resultados mostraram um grande potencial. Atualmente as silagens têm sido elaboradas a partir de resíduos de pescado - aquicultura, sobras de beneficiamento de indústrias pesqueiras e da fauna acompanhante. A análise em laboratório mostrou que as silagens possuem excelentes qualidades, sendo uma ótima fonte protéica e de energia. Desde que esses produtos sejam elaborados a partir de proteína animal, a composição de aminoácidos é a mais próxima dos requerimentos de animais que os da silagem de fonte protéica vegetal como soja.

A silagem possui grande importância quanto a sua utilização para formular rações destinadas aos animais domésticos. Vários países da região temperada do hemisfério norte, vem elaborando hidrolisado de pescado, com a intenção de preparar rações de baixo custo e alto valor nutricional para aves, suínos, bovinos, ovinos, peixes e outros animais domésticos (XIMENES CARNEIRO, 1991).

Baseado nos pontos acima discutidos, este trabalho tem como objetivo principal:

Analisar o valor protéico de silagem biológica de resíduo de pescado utilizada como ingrediente de rações animais.

Em decorrência deste objetivo geral, são objetivos específicos deste trabalho:

- i) Aplicar um processamento biológico em resíduo de pescado a fim de obter silagem como ingrediente para ração animal.
- ii) Caracterizar a composição química e nutricional da silagem biológica de resíduo de pescado.
- iii) Avaliar os resultados nutricionais da silagem biológica de resíduo de pescado pela comparação de dietas experimentais com ratos.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Histórico

Um molho de peixe espesso conhecido como “garum”, produzido pelos Romanos por volta de 525 a.C., foi o primeiro produto originado do aproveitamento dos subprodutos da pesca, principalmente guelras e vísceras. A técnica de obtenção assemelhava-se àquela atualmente empregada para obter silagem de pescado. As sobras do pescado eram acondicionadas compactamente em recipientes lacrados hermeticamente e deixados para decompor completamente. Através das enzimas proteolíticas presentes nas vísceras ocorria a autólise. Após a decantação do licor autolisado restava um resíduo denominado “alec” que, com a adição de mais peixe e salmoura, produzia uma substância pastosa chamada “putrilage”. O “garum” e a “putrilage” tornaram-se iguarias que eram exportadas do sul da Itália para todo o Império Romano (MANDELLI, 1972).

Na Finlândia, na década de 20, com a finalidade de preservar forragem verde, foi introduzido o método conhecido como A. I. V. pelo o professor A. I. Vintarnem. Consistia numa mistura de ácidos denominados A.I.V. ácida, que combinava o ácido sulfúrico e clorídrico. Através deste experimento, nos anos 30, comunidades de recursos escassos, carentes de tecnologia e com relativa abundância de produtos de pesca, começaram a produzir silagem de pescado pela necessidade de aproveitamento dos resíduos (DISNEY & JAMES, 1979).

Em 1936, a Suécia iniciou a fabricação de silagem, introduzindo além dos ácidos já utilizados, o ácido fórmico, e também a adição de melaço (DISNEY & JAMES, 1979).

Outros países, no decorrer da década de 40, iniciaram sua produção de silagem, destacando-se Canadá, Austrália, Noruega e Alemanha. No entanto,

somente Dinamarca, Polônia e Noruega produziram na escala comercial, utilizando o método da combinação de ácidos (STROM & EGGUM, 1981).

A implantação do processo de silagem no Sudeste Asiático deveu-se ao propósito de aproveitamento das perdas de captura do pescado de baixo valor comercial (KOMPIANG, 1981).

Na América Latina a partir do ano de 1953, o Uruguai vem desenvolvendo numerosas investigações com produtos obtidos por fermentação controlada e sua respectiva aplicação na nutrição de animais domésticos (BERTÚLLO, 1989).

O Instituto Tecnológico Pesqueiro do Peru, também tem realizado diversos trabalhos de aproveitamento de resíduos da pesca, usando o processo de silagem (ARECHE & BERENZ, 1987).

A Dinamarca é o país que atualmente possui importantes indústrias de silagem de pescado, porém, mantém sua produção limitada a quantidades previamente estabelecidas (RAA & GILDBERG, 1982).

Os pescados silados, na moderna prática utilizada na Europa, constam de uma mistura de pescado com carboidratos, como as farinhas de cereais, a mandioca ou o melão, colocados em contato com uma cultura de inóculo de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus* ou outros microrganismos (OETTERER DE ANDRADE, 1983).

Trabalhos recentes têm sido conduzidos utilizando a fermentação microbiana como meio de preservação ácida. A fermentação microbiana atua rápida e fortemente na produção de ácido láctico, a partir dos carboidratos, pelas bactérias produtoras deste ácido, gerando um ambiente propício ao não desenvolvimento da maioria das bactérias patogênicas e putrefativas (MOSSEL, 1971).

2.2 – Definições

KOMPIANG (1981) define silagem de pescado como um produto líquido preservado pela ação de ácidos (silagem química) ou por fermentação microbiana induzida por carboidratos (silagem biológica) ou ainda, conduzida pela ação de enzimas adicionadas ou naturalmente presentes nos tecidos (silagem enzimática).

De acordo com TATTERSON & WINDSOR (1974), silagem de peixe é o produto liquefeito obtido quando restos de processamento de peixes são triturados, moídos e misturados com ácido. Enzimas presentes na matéria-prima quebram a proteína e a liquefazem enquanto o ácido previne a ação microbiana.

RODRIGUEZ, MONTILLA & BELLO (1990) definem silagem ácida como um produto líquido estável e com odor a malte, preparado mediante a adição de ácido ao pescado inteiro ou porções de resíduos de pescado. A liquefação é causada por enzimas proteolíticas do pescado e, em grande parte, é acelerada pelo ácido, que auxilia também na desintegração dos ossos e contribui para a prevenção da deterioração bacteriana.

Os referidos autores afirmam que a silagem de pescado também pode ser obtida por via microbiológica, empregando para isto uma fonte de carboidrato fermentável e um inóculo de bactérias ácido-lácticas. Recentemente, têm-se desenvolvido silagens a partir da fauna acompanhante do camarão, mediante a incorporação de microrganismos e melão como fonte de carboidratos, tratando-se pois, de um método combinado de preservação química e fermentação microbiana.

2.3 - Métodos de processamento para obtenção de silagem

Nas primeiras tentativas para a obtenção de silagem, era utilizado um ácido inorgânico, o qual causava um processo fermentativo na biomassa que após a acidez atingida era denominada silagem. O método apresentava algumas

desvantagens, passando-se a usar a mistura de ácidos orgânicos e inorgânicos e obtendo-se, dessa forma, melhores resultados (WINDSOR & BARLOW, 1981).

2.3.1 - Método ácido

De acordo com RAA & GILBERG (1982), a silagem ácida é um método econômico de preservação de pescado, sendo feita por trituração da matéria crua, isto é, do peixe inteiro, de resíduos de filetagem ou vísceras, e adição de ácido orgânico e/ou inorgânico. STONE & HARDY (1986) postularam que o ácido evita a deterioração bacteriana, enquanto a autólise da proteína do peixe aumenta por ação das enzimas do próprio peixe ou por enzimas adicionais oriundas de fonte vegetal ou de microrganismos. O peixe torna-se líquido porque as estruturas dos tecidos são degradadas pelas enzimas naturais presentes no próprio peixe.

Na preparação da silagem ácida, a escolha do(s) ácido(s), como também o método pelo qual se realizará o processo, dependerá de alguns requisitos, os quais estão relacionados com facilidades de ordem técnica e econômica. Durante o processo de elaboração, é recomendável que se cumpram alguns requisitos básicos, como: a matéria prima deve ter um diâmetro de 3 a 4 mm, para o caso do pescado ser fragmentado; o ácido deve ser adicionado perfeitamente em todo o pescado, a fim de evitar zonas sem tratamento que possam entrar em decomposição; a biomassa deve ser agitada periodicamente para acelerar a liquefação e se possível, manter o produto a 20° C, a fim de proporcionar uma velocidade de liquefação adequada, pois em temperaturas menores, o processo é mais lento e à temperaturas maiores as enzimas proteolíticas podem ser inativadas (DISNEY & HOFFMAN, 1976).

A escolha do agente de preservação deverá ocorrer entre o ácido mineral, a mistura de ácidos, os ácidos orgânicos ou a mistura de ácidos minerais e orgânicos. Os ácidos mais freqüentemente usados na silagem são o fórmico, o propiônico, o acético e o sulfúrico, podendo ser usados sozinhos ou em combinações. Os ácidos orgânicos são geralmente mais caros do que os ácidos

minerais e produzem silagens que não são muito ácidas (pH de 4.0 a 4.5), dispensando a neutralização antes do uso. A ação bactericida do ácido deve ser considerada. No caso de se utilizar a proporção 1:1 fórmico-propiónico, e adição de 3% volume/peso à biomassa, a silagem que se obtém é estável, com aroma acidificado (KOMPIANG, 1981).

STROM & EGGUM (1981) reportaram a importância da preparação inicial da silagem em relação a trituração da matéria-prima e a mistura com ácido sulfúrico, fórmico ou acético, obtendo-se um produto líquido estável, com aroma maltado em boa qualidade de armazenamento.

O uso do ácido fórmico auxilia a mistura de ácido sulfúrico e clorídrico porque promove o abaixamento do pH a níveis entre 4.0 e 4.5, enquanto que o uso de ácidos mineral sozinhos baixa o pH para 2.0, necessitando, assim, de uma neutralização posterior à hidrólise (WIGNALL & TATTERSON, 1977).

Após a morte do pescado, as enzimas proteolíticas que estão naturalmente presentes principalmente nos órgãos digestivos, continuam suas atividades, favorecendo a liquefação gradual da silagem química. A enzima protease é a grande responsável pela autólise, devido o maior componente estrutural dos tecidos ser a proteína. O pH 5.5 é ótimo para a ação dessa enzima sobre as miofibrilas, enquanto para a hemoglobina um pH abaixo de 4.0 é o mais indicado. Foi comprovado que a silagem é constituída de três fases: a líquida, a aquosa solúvel e o sedimento insolúvel (MACKIE, 1973; RAA & GILDBERG, 1976; HALL *et al.*, 1985).

Segundo CANONIZADO (1980), a preservação ácida ocorre devido à quebra da proteína pelo ácido, em pequenas unidades solúveis, tornando o produto numa forma semi-líquida e criando, através da acidez, condições desfavoráveis ao crescimento de bactérias. Enzimas proteolíticas presentes no próprio músculo do pescado contribuem para a hidrólise por quebra dos peptídeos

que não são hidrolisados pela ação do ácido, completando o processo de liquefação.

Dois fatores são fundamentais no processo de liquefação da silagem: o tipo de matéria-prima e a temperatura. Peixes frescos e peixes gordurosos se liquefazem mais rapidamente. Para uma liquefação mais rápida faz-se necessário que o tempo de mistura, matéria-prima e ácido sejam o mais rápido possível e que a temperatura da mistura fique sempre em torno de 20° C, pois abaixo dessa temperatura o processo torna-se lento. É recomendável no período de inverno, o aquecimento inicial da mistura (TATTERSON & WINDSOR, 1974; STROM & EGGUM, 1981).

Segundo JOHNSON *et al.* (1985), em silagem de pescado a solubilidade da proteína foi maior após a digestão com ácido fórmico e os níveis de aminoácidos livres foram altos logo após a fermentação.

BACKHOFF (1976) comenta que a silagem convencional é acidificada a um pH entre 3.9–4.2 a qual, em três dias, a uma temperatura ambiente de 27 a 30°C, se liquêfaz o suficiente para restabelecer a camada de lipídios, conservando a atividade enzimática por vários meses.

BERAQUET & GALACHO (1983), através de experimento com silagem química, utilizando 3% em peso de ácido fórmico a 90%, observaram ser este teor suficiente para preservar a silagem de peixe inteiro e resíduo de camarões, durante o período de 30 dias de estocagem.

As desvantagens das silagens químicas líquidas se devem ao grande volume e ao difícil manejo. A menos que se use ácido fórmico deve-se neutralizá-las antes de seu fornecimento como ração. Além disso, esse método implica numa ação drástica dos elementos preservadores, os quais também afetam a qualidade das proteínas, e, portanto, seu efeito nutricional, com decréscimo notório da digestibilidade do produto, em relação a outras técnicas de elaboração menos

agressivas. Quanto mais tempo ficar estocada a silagem líquida, mais pobre será seu valor nutricional devido à oxidação lipídica levar ao escurecimento da silagem e, conseqüentemente, à diminuição do seu valor como alimento (KRISTI, 1997).

Para facilitar o manejo, transporte e armazenamento foi desenvolvida uma técnica de obtenção do produto seco. Para isto, é necessário que se use uma combinação de ácido fórmico e ácido mineral. Se o processo de secagem não for eficiente, um pH 2.0 com 1% de ácido fórmico é requerido; porém, se as condições são boas, são aceitos um pH menos ácido e uma menor proporção de ácido fórmico (KRISTI, 1997).

2.3.2 - Método biológico

A fermentação láctica vem sendo utilizada há vários séculos como método de preservação de alimentos. As bactérias lácticas fazem parte da microbiota de leite e vegetais em fermentação e ainda hoje é comum o uso de processos empíricos que resultam na seleção natural de microrganismos provenientes do ambiente, que passam a ser usados como inócuos em processamentos posteriores. Um exemplo deste tipo de cultura é o fermento biológico a base de vegetais utilizado na produção de hidrolisado biológico de pescado (SANTOS *et al.* 1986).

A metodologia da silagem biológica consiste, basicamente, em misturar fontes de carboidratos de baixo custo (melaços, vegetais ou frutas) ao pescado triturado e em aproveitar enzimas próprias do pescado ou adicionar culturas puras ou mistas de microrganismos proteolíticos ou preparados enzimáticos (SANCLIVIER, 1985)

O fermento láctico é composto de uma ou mais linhagens de bactérias lácticas pertencentes ou não ao mesmo gênero ou espécie, sendo utilizado para inocular um produto cru ou pasteurizado, a fim de iniciar uma fermentação (SANTOS *et al.* 1986)

Segundo OWENS & MENDONZA (1985); BERTULLO (1989) durante o processo de preparação da silagem biológica o abaixamento do pH até 4.5 em menos de 50 horas reduz ao mínimo os fenômenos da putrefação e outras mudanças indesejáveis que sofre o pescado ao se decompor. A preservação completa-se com a formação de substâncias bacteriostáticas e bactericidas produzidas por fermentos lácticos, como também pela transformação dos açúcares solúveis do material em ácidos orgânicos, como o ácido láctico, acético, butírico promovendo a acidificação do meio.

LESSI et al., (1989) obtiveram cinco formulações de fermentos biológicos utilizando diferentes proteases, como a papaína e a bromelina, e diferentes fontes de carboidrato, como farinha de trigo e farinha de mandioca, todas apresentando bom desenvolvimento fermentativo quando foram utilizadas para promover a hidrólise do pescado.

Um melhor processo fermentativo para a silagem de resíduos de pescado é alcançado com a inoculação a 10% do peso total da silagem de um fermento biológico constituído de resíduos vegetais, farinha de trigo, vinagre e sal, mantido em condições anaeróbicas e protegido da luz, por um período de incubação de 14 dias. (XIMENES CARNEIRO, 1991).

Para a produção da silagem biológica, é de suma importância a presença de uma população bacteriana que promova o processo de fermentação de açúcares, produzindo ácido láctico que ocasiona um abaixamento do pH, característica fundamental à conservação do produto. O processo fermentativo é dependente do número inicial de bactérias produtoras de ácido láctico, visto que o pescado apresenta um número muito reduzido de bactérias que produzem o ácido láctico, fazendo-se necessário a adição desses microrganismos (XIMENES CARNEIRO, 1991).

A preparação de uma silagem asséptica é praticamente impossível. É necessário que o número inicial de bactérias ácido-lácticas esteja próximo de 2 x

10^8 por grama, se a temperatura for de 20°C , e para uma temperatura de 25°C será necessário menos inoculo (OETTERER DE ANDRADE, 1983).

No decorrer do processo fermentativo três grupos de microrganismos são encontrados: as bactérias lácticas, as enterobactérias e as leveduras. Desses, o grupo láctico é o mais importante e, dentro do mesmo, determinadas espécies são responsáveis pela maior produções de ácido lácticas e pelas características do produto. Numa fermentação normal, as enterobactérias terão seu desenvolvimento inibido quando o pH do meio atinge valores ao redor de 4.5. As leveduras sempre estarão presentes e deve-se evitar ao máximo seu crescimento, principalmente as oxidativas e superficiais, que se desenvolvem melhor no final da fermentação, dada a existência de maiores teores de ácido láctico, que é consumido pelas mesmas. Isso acarreta a elevação do pH e possibilitará o crescimento de microrganismos deterioradores do material em fermentação (GOLDONI, 1983).

As bactérias homofermentativas produtoras de ácido láctico crescem em substratos como os carboidratos e reduzem o pH para 4.5 – 4.0 em 48 a 50 horas. As bactérias heterofermentativas, além do ácido láctico, produzem álcool etílico e dióxido de carbono, como também outras substâncias como as que dão sabor amargo ao produto, quando se usa a frutose como substrato (VILLELA DE ANDRADE & FRANQUEIRA DA SILVA 1989).

Fatores tais como a espécie de pescado ou o tipo de resíduo, a disponibilidade do carboidrato fermentável, o tipo de microrganismo utilizado, as condições de anaerobiose, a temperatura, a concentração de cloreto de sódio, a concentração de ácidos orgânicos e o valor de pH, a produção de outros compostos inibidores, a capacidade tampão do substrato, o número inicial de bactérias ácido-lácticos e o número inicial de competidores microbianos vão influenciar diretamente nas três características fundamentais para o desenvolvimento fermentativo da silagem: o crescimento das bactérias ácido-lácticas; a velocidade pela qual o valor de pH do fermentado se reduz e; a inibição

dos microrganismos competitivos (OWENS & MENDOZA, 1985; MACKIE *et al.*, 1971; BERTULLO, 1989).

2.4 - Composição química do pescado

A composição química do pescado é extremamente variável de espécie para espécie ou numa mesma espécie, dependendo da época do ano, do tipo de alimento mais abundante, do grau de maturação gonadal, do sexo, do tamanho, idade e, em um mesmo exemplar, da parte do corpo e do tipo de músculo analisado. O conteúdo da gordura do peixe varia largamente com as espécies (EXLER *et al.* 1975), com a estação do ano (THOMPSON, 1969), com o estado fisiológico do peixe (JACQUOT, 1961). O conteúdo de gordura do peixe varia, também, de acordo com o tipo de músculo, com as partes do corpo considerada, com a dieta do peixe (STANSBY, 1962). Esse conteúdo varia, ainda, entre peixes naturais ou cultivados (KRYZNOWEK *et al.*, 1983) e de acordo com a localização geográfica (BANNATYNE & THOMAS, 1969).

Para CONTRERAS-GUZMÁN (1994), a disponibilidade das informações sobre a composição química de pescado é importante pelos seguintes aspectos: (a) padronização dos produtos alimentares na base de critérios nutricionais; (b) fornecimento de subsídios para decisões de caráter dietário; (c) acompanhamento de processos e pesquisas através de mudanças nos componentes químicas e; (d) seleção de equipamentos certos para otimização econômico-tecnológica.

O pescado tem como principal constituinte a água cujo percentual varia de 66 a 84% de seu peso. Os teores de proteína oscilam de 15 a 24%; os lipídios, de 0,1 a 22%, e as substâncias minerais, de 0,8 a 2%. O teor de glicogênio em alguns teleósteos chega ao máximo de 0,3%. Muitos minerais ocorrem em traços, bem como as vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis.(OETTERER DE ANDRADE, 1991).

Os lipídios são os componentes que mais variam devido haver um aumento progressivo do teor de gordura da carne a partir da cauda para a cabeça, sendo que o teor de lipídios do fígado mostra grandes flutuações sazonais influenciadas pela variação na alimentação e mudanças metabólicas no peixe durante o ciclo reprodutivo (STONE & HARDY, 1986).

Basicamente as diferenças de composição entre as espécies referem-se ao teor lipídico, levando a uma classificação de tipo gordos, semigordos e magros. O teor de aminoácidos também é variável quando se observam algumas espécies e seus estágios fisiológicos (THOMPSON, 1969).

Na composição orgânica do peixe, a quantidade e tipo de minerais e vitaminas podem variar, dependendo do habitat da espécie, se a mesma é de água doce ou água salgada ou do tipo de peixe, se ósseo ou cartilaginoso (OGAWA, 1999).

2.5 – Composição química da silagem

A composição do resíduo e as espécies utilizadas na silagem são condições fundamentais da variação dos valores encontrados na determinação da composição centesimal. A composição química da silagem vai depender fundamentalmente do tipo de matéria-prima ensilada, de seu estágio de maturidade e do processo utilizado (ARECHE & BERENZ, 1987).

Segundo OETTERER DE ANDRADE (1991), a composição química do ensilado de pescado se mostrou semelhante à da matéria-prima. A faixa de variação para proteína é de 14,5 a 17%, sendo que os ensilados oriundos de peixe inteiro têm mais proteínas. O teor de umidade varia inversamente com o teor de lipídios. Há decréscimo de 2 a 7% na umidade em processos mantidos a 23° C. O teor de cinzas médio é de 2,5%, aumentando para 4,2% para ensilados elaborados a partir de carcaças. O teor de óleo varia com a espécie sendo de 0,5 a 16,3%.

A variação do conteúdo protéico nos ensilados pode ser associada a vários fatores, entre eles a variedade de espécies de peixes e as partes utilizadas no processamento peixe inteiro, cabeça, guelras, vísceras (HALL & LEDWARD, 1986).

2.5.1 - Proteínas e aminoácidos

2.5.1.1 - Proteínas

Conceito introduzido por Mulder em 1839, proteína é um nome derivado da palavra grega “proteus” que significa “de primeira ordem ou importância”. As proteínas são macromoléculas de polímeros cuja unidade básica estrutural são os aminoácidos, unidos por ligações peptídicas (CONN & STUMPF, 1990). Elas contém, na molécula, elementos como carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre; têm composição bastante similar, cujas concentração são 50 a 55% de C, 6 a 8% de H, 20 a 24% de O, 15 a 18% de N e 0,2 a 0,3% de S. Há proteínas em que o teor de enxofre chega a 5% e, raramente, contém fósforo na sua composição (BOBBIO & BOBBIO, 1989).

A Sociedade Britânica de Fisiologia, em 1907, propôs a classificação das proteínas, baseada nas suas características de solubilidade, sendo as três maiores classificadas como: simples, conjugadas e derivadas (TELES, 1981).

As proteínas do pescado são classificadas em extracelulares, (colágeno e elastina), e intracelulares, (actomiosina, miógeno e mioalbumina). No eglefino (*Gadus aeglefinus*), há de 95% a 97% de proteína intracelular, compreendendo de 65% a 75% de miosina e 10% de miógeno, de 3% a 5% de proteína extracelular, que é constituída de colágeno e elastina, 0,5% de núcleo-proteínas e hemoglobinas. (OETTERER DE ANDRADE, 1983).

Segundo NEVES & VIEIRA (1991), as múltiplas funções desempenhadas pelas proteínas exigem variabilidade de estrutura, a qual se consegue devido à existência de 20 aminoácidos diferentes contendo, em suas

moléculas, distintos grupos químicos que possibilitam vários tipos de ligações químicas. De acordo com KRAUSE & MAHAN (1989), as proteínas de um alimento fornecem aminoácidos para a síntese protéica, tendo ainda uma série de funções metabólicas especiais tais como: utilização na constituição dos tecidos novos; atuação como fonte de calor e energia; função hormonal; manutenção da pressão osmótica e coloidal do plasma; ação no transporte de moléculas; função como anticorpos nas reações inflamatórias; ação na contração muscular. As proteínas são responsáveis, ainda, pela transmissão do código genético através das histonas presas aos ácidos nucléicos.

2.5.1.2 - Aminoácidos

Aminoácidos são blocos construtores das proteínas, que apresentam, na sua composição, um grupo amino ($-NH_2$) receptor de elétrons e um grupo carboxila ($-COOH$) doador de prótons, exceto a prolina, que contém um grupo imino ($-NH-$) em substituição ao aminogruppo o qual difere pela estrutura da cadeia lateral ou grupo R (MARZZOCO & TORRES, 1990; CHAMPE & HARVEY, 1996). A fórmula geral, comum a todos os aminoácidos é $RCHNH_2COOH$.

A propriedade mais importante dos aminoácidos é, sem dúvida, a capacidade desses compostos de formarem amidas pela interação intermolecular entre grupos carboxílicos e amínicos, permitindo a formação de peptídios e proteínas (SGARBIERI, 1996).

No pescado os teores de aminoácidos são bastante variáveis entre espécies. Sardinhas, por exemplo, apresentam teores de triptofano, valina, lisina, isoleucina, leucina e treonina adequados do ponto de vista nutricional, considerando a proteína-referência da Food and Agriculture Organization (FAO). Há variações nos teores de arginina, histidina e triptofano entre as espécies (SGARBIERI, 1996).

A presença de nitrogênio não protéico no pescado inclui os aminoácidos livres, as bases nitrogenadas voláteis, particularmente amônia, certas bases como o óxido de trimetilamina, a creatina, a taurina, as betaínas, o ácido úrico, a anserina e a carnosina (OETTERER DE ANDRADE, 1983).

Entre os vinte aminoácidos que compõem a proteína, dez não podem ser freqüentemente sintetizados na velocidade necessária e, por isso, devem ser supridos na dieta, sendo denominados de essenciais. Destes 10 aminoácidos, oito são essenciais durante todo o tempo da vida, como isoleucina (ILE), leucina (LEU), lisina (LYS), metionina (MET), fenilalanina (PHE), treonina (THR), triptofano (TRP) e valina (VAL). Os outros dois, essenciais apenas na infância, são a arginina (ARG) e a histidina (HIS). Os que são sintetizados pelo organismo humano são chamados não essenciais, como o ácido aspártico (ASP), a serina (SER), o ácido glutâmico (GLU), a glicina (GLY), a alanina (ALA) e a prolina (PRO). (FAO, 1973; TELES, 1981; MONTGOMERY *et al.*, 1994).

2.5.2 - Ácidos graxos

Os ácidos graxos que fazem parte dos lipídios ou gorduras são, em grande número, pertencentes a dois grupos, o dos não-saturados e os saturados, constituindo o estado de saturação ou insaturação uma importante característica química, assim como nutricional face o papel exercido por certos ácidos graxos nos processos metabólicos e imunitários (FRANCO, 1992).

O tipo e a configuração dos ácidos graxos nos lipídios caracterizam as diferenças no sabor, textura, ponto de fusão, absorção, atividade metabólica e biológica (FRANCO, 1992).

A classificação dos ácidos graxos pode ser estabelecida, em função de seu grau de saturação, dos ácidos graxos constituintes e das fontes alimentares, isto é, em função do carbono terminal, tamanho da cadeia e da função orgânica. São exemplos de ácidos graxos de gorduras saturadas os ácidos acéticos,

araquídico, butírico, cáprico, caprílico, capróico, esteárico, lignocérico, mirístico, palmítico e propiônico, enquanto que nas gorduras monoinsaturadas são encontrados os ácidos oléico e palmitoléico e, nas gorduras poliinsaturadas, o linoléico, araquidônico e linolênico (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O nível de ácidos graxos livres nos óleos de pescado é uma medida do grau de hidrólise ocorrida nos glicerídios e é usado para determinar o grau de comestibilidade deste alimento. Os óleos de alta qualidade não apresentam níveis de ácidos graxos livres superiores a 3%, expressados como percentual de ácido oléico. Os óleos devem ser retirados da silagem tão logo o material apresente fluidez suficiente para ser bombeado ou centrifugado. Durante a primeira semana de estocagem, se a temperatura estiver acima de 20°C, a oxidação dos ácidos graxos livres ocorre mais facilmente, ocasionando o escurecimento do óleo (REECE, 1980).

JOHNSEN & SKREDE (1981) verificaram que a composição em ácidos graxos do óleo da silagem ácida de peixes, elaborada a partir do bacalhau (*Gadus marrhua*), apresentava as seguintes porcentagens (p/p): 14:0 (3,5%), 16:0 (13,2%), 18:0 (4,1%), 16:1 (9,2%), 18:1 (25,0%) 20:1 (12,3%), 22:1 (5,7%).

2.5.3 – Minerais

SATHE *et al.* (1984) citaram que os minerais estão mais biodisponíveis nas fontes animais do que nas fontes vegetais e que sua utilização biológica pode ser afetada por fatores que incluem a digestibilidade do alimento que o contém, a forma química do próprio mineral, os níveis dietéticos de outros nutrientes, a presença de quelatos para os animais, o tamanho da partícula do alimento e as condições de processamento que, direta ou indiretamente, podem alterar o nível ou a forma química de minerais ou associar os minerais com outros componentes do alimento.

Acredita-se ser a silagem uma boa fonte de minerais, devendo-se utilizar, de preferência, na preparação do processo, os peixes inteiros ou vários tipos de resíduos do pescado, para que assim seja determinada uma gama maior de minerais. SMITH (1977) encontrou um teor elevado de cálcio e fósforo em silagens que foram preparadas com a porção óssea do pescado.

Outras silagens preparadas a partir das vísceras do pescado mostraram ter um menor conteúdo de minerais do que aquelas elaboradas com o pescado inteiro ou resíduos misturados - guelras, escamas, esqueleto, restos musculares (SMITH, 1977).

KOMPIANG (1981) confirmaram um teor muito mais alto de cálcio no peixe inteiro do que na carne ou vísceras de peixe, associando esta diferença à presença do esqueleto e às escamas, por conterem fosfato tricálcio e carbonato de cálcio. STONE & HARDY (1986) concluíram ser o teor de cálcio extremamente variável entre as espécies, a carne e as vísceras.

A variação existente no teor de fósforo em músculos de peixes está associadas ao sexo e à idade. STONE & HARDY (1986) citam quantidades de fósforo no pescado fresco variando entre 1,1 a 2,5% na carne de cavala e 0,8 – 1,4% na carne de linguado fresco.

O teor da maioria dos minerais no peixe integral ou nas sobras de peixes - cabeça, cauda e vísceras - deverá ser maior do o que da carne ou das vísceras por causa da alta concentração desses minerais nos ossos, muito embora alguns elementos também se concentrem em partes. As vísceras, como por exemplo, as ovas do badejo (*Pollachins pollachins*), são ricas em ferro, cobre e zinco. Há minerais, por exemplo - lítio, selênio e estanho, sobre os quais existe pouca literatura quanto ao seu teor tanto no peixe inteiro, quanto em resíduos de peixe e, em silagem (KOMPIANG *et al.*, 1981).

2.6 - A silagem de pescado e seu valor nutritivo

A obtenção de proteínas de baixo custo, nos dias atuais, tem sido considerada um problema ao nível de produção de alimentos concentrados para animais, sendo necessária a busca de fontes alternativas de proteínas de diferentes origens (GUEVARA; BELLO; MONTILLA, 1991).

Uma das alternativas de fonte de proteína é o processo de silagem de pescado, produto de fácil elaboração, baseado na acidificação do meio, de modo a favorecer a proteólise do pescado, o que pode ser feito tanto quimicamente por acidificação quanto biologicamente pela incorporação de bactérias homofermentativas a um substrato rico em açúcares fermentáveis. Em resumo, a técnica de conservação do pescado ou de seus subprodutos - resíduos da indústria pesqueira - baseia-se na elevação da acidez e, conseqüentemente no abaixamento do pH. O produto pode ser obtido numa forma pastosa quase líquida ou líquida, podendo ser incorporado a rações como fonte de proteína (TATTERSON & WINDSOR, 1974).

O valor nutritivo dos alimentos depende, em primeiro lugar, da concentração e do balanço dos nutrientes considerados dieteticamente indispensáveis. Alimentos como as carnes, os peixes, os derivados lácteos e grãos e farinhas de leguminosas são particularmente ricos em proteínas, sendo fontes principais desse nutriente. A concentração de proteína nesses alimentos varia de 20 a 35% apresentando uma grande variabilidade em sua qualidade nutritiva, que vai depender, principalmente, da concentração e da proporção relativa dos aminoácidos dieteticamente indispensáveis que compõem a proteína (SGARBIERI, 1987)

É grande a utilização potencial de resíduos de pescado como suplemento protéico. O total de aminoácidos e a proporção entre eles fornecida pela ração é que determina o seu valor nutritivo, principalmente quando as proteínas são provenientes de fontes de origem vegetal, as quais são deficientes

em alguns aminoácidos. Nestes casos a ração pode ser melhorada pela adição de quantidades de proteína de pescado (GEIGER *et al.* 1962).

O valor nutritivo da silagem pode ser alterado de acordo com o grau de frescor da matéria-prima, as condições de armazenamento e com a ocorrência de contaminação prévia à elaboração da silagem. Tais fatores, portanto, alteram a qualidade nutricional da ração. Essa qualidade nutricional se deve, principalmente, a presença de lisina e triptofano, entre outros aminoácidos essenciais e por sua digestibilidade protéica. (OETTERER *et al.* 1992).

A disponibilidade de aminoácidos livres na forma L confere qualidade nutricional positiva às silagens biológicas (HIETALA *et al.* 1979). Os aminoácidos são relativamente estáveis. Na silagem de pescado, por exemplo, somente 8% de nitrogênio amino se transforma em amônia, em silagem de vísceras de bacalhau armazenadas por 220 dias a 27° C. Porém, se a amônia se forma a partir dos aminoácidos essenciais há maior reprodução do valor nutricional. O triptofano tende a se decompor nos ensilados ácidos, mas a metionina e histidina são mais estáveis (BACKHOFF, 1976; RAA e GILBERG, 1982; JACKSON *et al.* 1984; HALL *et al.* 1985).

Silagens de pescado, por conter proteínas de boa qualidade e outras substâncias que influenciam o crescimento de animais, vêm sendo estudadas para uso em alimentação de suínos, bovinos e aves. A silagem biológica está sendo pesquisada em experimentos com ratos, gatos e suínos (MARTIN & PATEL, 1992).

Trabalhos experimentais, de produção de silagem de pescado foram realizados na Indonésia com o propósito do uso em substituição à proteínas convencionais, como a farinha de peixe ou de soja, no arraçamento de porcos, peixes e frangos (KOMPIANG, 1981).

Para peixes cultivados, salmonídeos e carpas, dietas à base de silagem de peixe têm se mostrado excelente, principalmente quando a matéria-prima sofre um cozimento antes do processo de ensilagem.

Em pesquisas realizadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, e divulgadas pelos informativos da FAO, LESSI et ali (1989), XIMENES CARNEIRO (1991) testaram pela primeira vez no Brasil, a silagem biológica de pescado na alimentação de alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e na alimentação da fase de pós larva de camarão (*Macrobrachium rosenbergii*). Os autores apontam a ensilagem como uma alternativa e um substituto potencial da farinha de peixe e da farinha de carne e ossos nas rações destinadas ao tambaqui. Vários tipos de silagens foram preparados com resíduos de jaquari (*Semaprochilodus, ssp*) com adição de componentes e frutas da região, como repolho e mamão. As dietas além da silagem biológica eram acrescidas de soja, milho e complexo vitamínico mineral.

As silagens biológicas, quanto ao valor nutricional apresentam melhor desempenho em aves, em relação às silagens ácidas, em função do seu efeito protetor contra a oxidação dos lipídeos. (NUNES, 1999).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Carnes e Pescado, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, e no Biotério de Experimentação Animal, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará.

3.1 – Matéria-prima

Para a realização desta pesquisa foram utilizados resíduos congelados de pescado de águas marinhas - cabeças, guelras, esqueleto, restos musculares e vísceras - oriundos de peixaria local. A partir dos resíduos de pescado, adicionados de fermento biológico, farinha de trigo e sal, elaborou-se duas silagens biológicas, objeto deste estudo.

3.2 – Preparação do fermento biológico

Na elaboração do fermento biológico seguiu-se a formulação de LUPIN (1983): repolho (*Brassica oleracea*) 41%; mamão (*Carica papaya*) 31%; farinha de trigo 17%; vinagre de álcool 8% e; sal de cozinha 3%. (Ver Figura 01).

O repolho e o mamão foram triturados em um cutter até completa uniformização e, a seguir, adicionados a farinha de trigo, o vinagre e o sal. A mistura foi totalmente homogeneizada sendo então acondicionada em saco de polietileno preto, para evitar a incidência de luz. Fechou-se a abertura do saco para criar condições anaeróbicas. O fermento permaneceu 10 dias incubado à temperatura ambiente ($27 \pm 3^{\circ}\text{C}$) sendo que, a cada 24 horas, era retirada uma alíquota para verificação do pH. Ao término do período de incubação, o fermento atingia sua estabilidade, alcançando um pH em torno de 3.3.

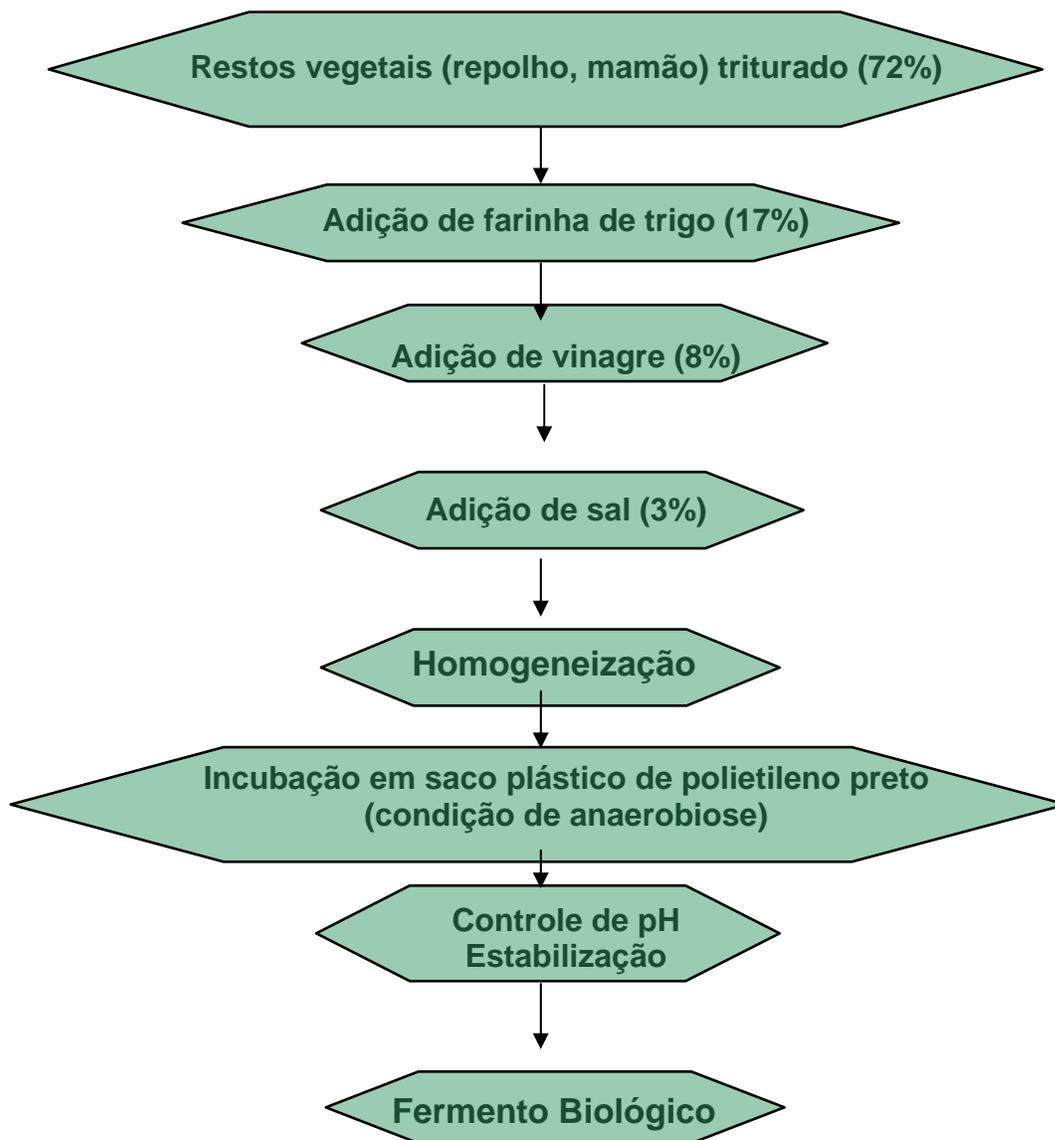


Figura 01 – Fluxograma das etapas de formulação do fermento biológico (Ver também **Figura 03**)

3.3 – Obtenção da silagem biológica

Foram elaboradas 2 silagens de composição e formulação iguais, em tempos diferentes. A silagem A, foi estocada por 90 dias sendo que, quando essa estava aos 60 dias de armazenamento, foi elaborada a silagem B. A finalidade era que ambas estivessem adequadas para o ensaio biológico, ou seja, tempos de armazenamento de 90 (silagem velha) e 30 dias (silagem nova), respectivamente.

Para a elaboração das silagens biológicas, os resíduos foram descongelados a temperatura ambiente ($27^{\circ} \pm 3^{\circ} \text{C}$) durante 2 horas. Após total descongelamento, foram triturados em moinho picador de carne Siemsem, Modelo PSL ,equipado com placa de furos de 0,8 cm de diâmetro e, homogeneizados mediante agitação mecânica. Da massa de resíduos, foi retirada uma porção para a determinação da composição química proximal. (Figuras 02 e 04).

Na formulação das silagens incorporaram-se à 56% da massa de resíduos, 10% de fermento biológico, 30% de farinha de trigo e 4% de sal de cozinha. Todos os ingredientes foram misturados manualmente com espátula de madeira, até a formação de uma biomassa que foi acondicionada em balde plástico tampado, para dar condições de anaerobiose. A cada 24 horas, a biomassa era revolvida para que fosse alcançada uma completa uniformização e assim, permitir que o processo fermentativo ocorresse de forma generalizada ,sendo então coletada uma amostra para medição de pH. (Figura 05).

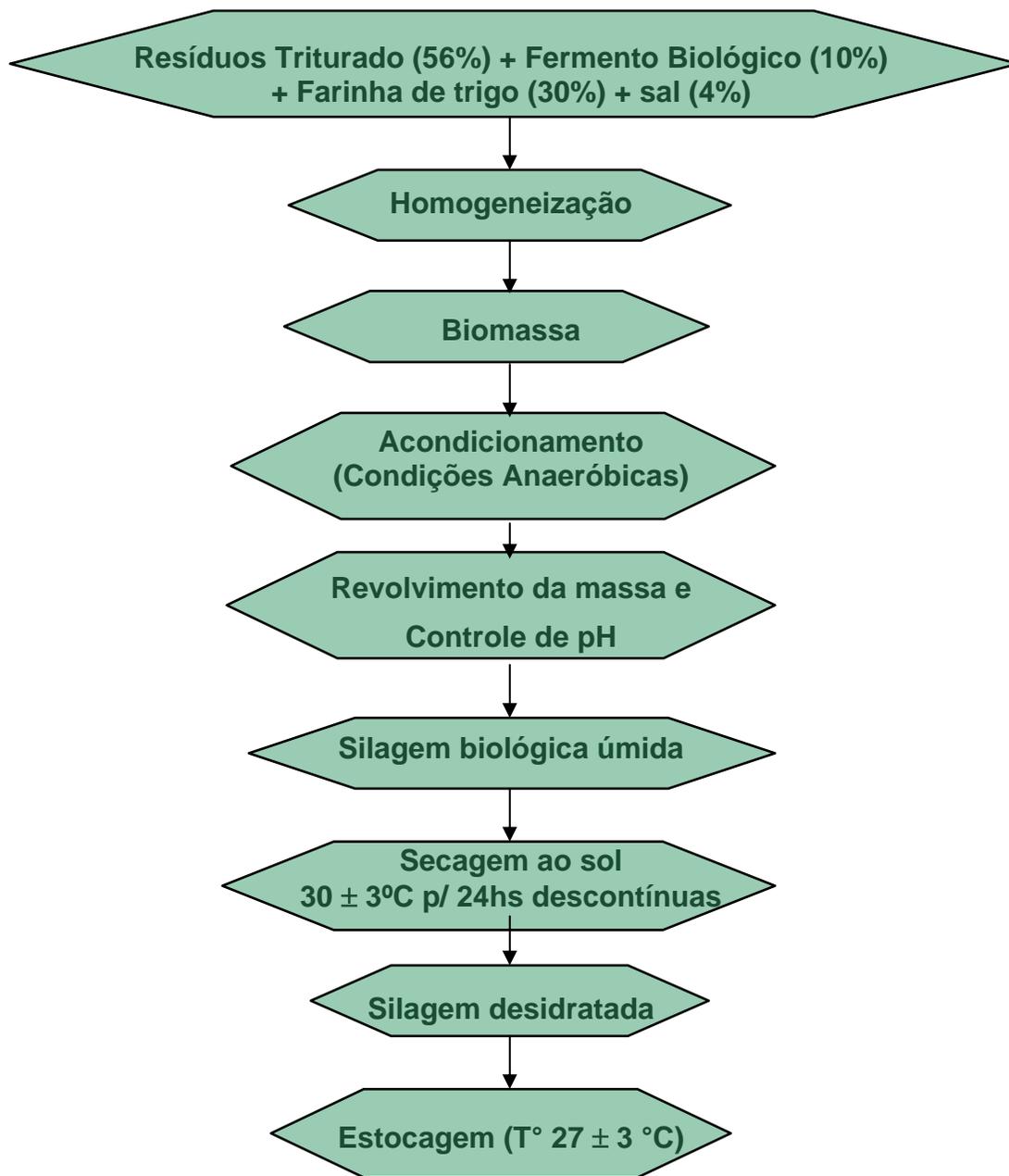


Figura 02 – Fluxograma das Etapas de obtenção da silagem biológica de resíduos de pescado.

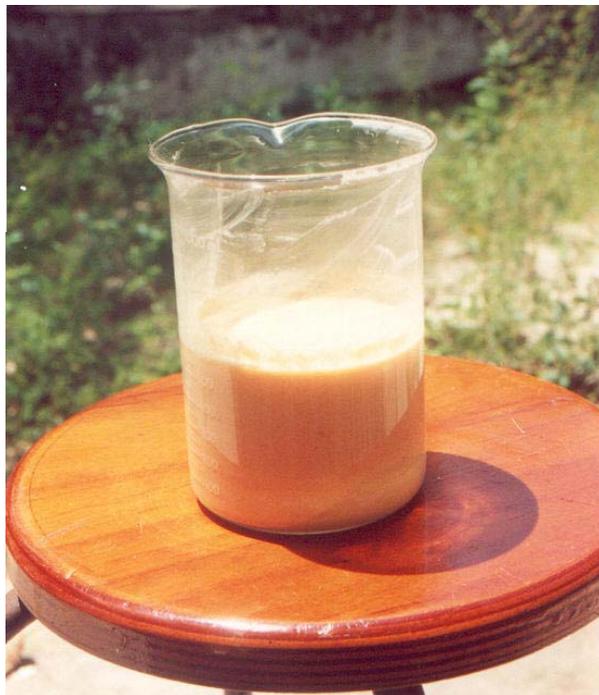


Figura 03 – Fermento biológico.



Figura 04 - Resíduo de pescado triturado.

Durante todo o período de hidrólise, foram observadas as características organolépticas do produto tais como cor, odor e textura. Ao final, após estabilização do pH, foi coletada novamente uma amostra para análise de composição centesimal e da acidez expressa em ácido láctico.

3.4 – Secagem e estocagem da silagem

Ao final do processo de silagem, a biomassa úmida era exposta a secagem solar e ao vento à uma temperatura, de $30^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas descontínuas. Durante o período de secagem, a biomassa era revolvida para garantir a uniformização do processo e conseqüente obtenção de um produto seco de qualidade. (Figura 06). O rendimento foi calculado após a total secagem do produto, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Peso da silagem seca}}{\text{Peso da silagem úmida}} \times 100$$

Após a coleta de amostra para análise centesimal, o produto final foi embalado em sacos de polietileno de cor preta devidamente fechados, e acondicionado em monoblocos plásticos furados. As silagens embaladas, permaneceram à temperatura ambiente ($27 \pm 3^{\circ}\text{C}$) no depósito do laboratório de processamento de pescado por um período de 90 dias (silagem A) e de 30 dias (silagem B).

Amostras das silagens A e B, foram coletadas para determinação da composição química e avaliação nutricional com determinação dos perfis de minerais, aminoácidos, e de ácidos graxos, bem como para análises microbiológicas.



Figura 05 - Silagem biológica



Figura 06- Silagem biológica seca.

3.5 – Determinações analíticas

3.5.1 – Composição Centesimal

Umidade – determinada em estufa a 100 – 105° C até peso constante, de acordo com AOAC (1984).

Proteína – o nitrogênio total foi determinado pelo método micro Kjeldahl, de acordo com o método padrão da AOAC (1984) e o teor protéico expresso como % N x 6,25.

Lipídios – o teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet, usando hexano como solvente de extração (AOAC, 1984).

Cinzas – o teor de cinzas foi determinado em mufla a 525°C, segundo método padrão da AOAC (1984).

3.5.2 – Análises Físico-Químicas

pH – a determinação do Ph foi efetuada em um medidor de pH DIGI-SENSE, utilizando o eletrodo direto na amostra.

Acidez expressa em % ácido láctico – a acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, utilizando, como indicador, 0,5 mL de fenolftaleína 1,5%. A quantidade de NaOH titulada foi multiplicado pelo fator 0,009, fator de conversão do ácido láctico na amostra (I.A.L., 1985).

3.5.3 - Caracterização Nutricional

3.5.3.1 - Determinação de minerais

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia adotada por MALAVOLTA (1989).

As determinações de fósforo, potássio, cálcio magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês foram realizadas em extrato nítrico-perclórico (0,5g MS/50 mL).

O fósforo total no extrato nítrico-perclórico foi determinado por calorimetria.

O potássio no extrato nítrico-perclórico foi determinado por fotometria de chama.

Cálcio, manganês, ferro, cobre, zinco e manganês no extrato nítrico-perclórico foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica.

3.5.3.2 - Determinação de aminoácidos totais

Foram determinadas nas silagens desengorduradas, ou seja, com menos de 1% de óleo, o teor dos aminoácidos totais, de acordo com o método descrito por SPACKMAN, STEIN & MOORE (1958), utilizando-se o sistema BIOCHROME 20, da PHARMACIA.

Pesaram-se cerca de 20 mg da silagem em balança analítica METTLER, em 6 ampolas próprias para hidrólise, e adicionou-se 1 mL de HCl 6N, contendo fenol a 0,1% (p/v) para prevenir a oxidação. Selou-se cada ampola no maçarico, colocando a seguir, em estufa convencional a 110°C, por 20 horas. Após hidrólise, as ampolas foram resfriadas, abertas e colocadas em dessecador contendo sílica gel e NaOH sob vácuo, para evaporação do ácido. Após 3

lavagens do resíduo com cerca de 0,5 mL de água passada no aparelho milli-Q, para eliminar a acidez, este foi seco a vácuo, em dessecador contendo pentóxido de fósforo. Após a secagem, redissolveram-se os aminoácidos em 1 mL do tampão citrato de sódio 0,20 M e pH 2,20 e, com o auxílio de uma seringa descartável de 3 mL, arrastou-se todo o material de cada ampola, filtrando-se para os “eppendorfs”, através de microfiltros MILLIPORE de porosidade 0,45 μ M e 13 mm de diâmetro. Depois da filtração os materiais hidrolisados foram colocados no freezer para aplicações no auto analisador. Para as corridas das amostras, 15 μ l foram injetados no equipamento e os aminoácidos dissolvidos na forma protonada. Ao atingirem a coluna de troca iônica de alta performance BIO 20 PEEK, foram eluídos através do sistema tampão, citrato de sódio de pHs crescentes de 3,20, 4,25 e 6,45, injetados na coluna automaticamente, de acordo com a programação do aparelho. Ao saírem da coluna, os aminoácidos se misturaram ao fluxo do reagente de ninidrina, originando produto de cor azul-violeta lida a 570nm, para todos os aminoácidos, exceto para a prolina e hidroxiprolina, que produzem substância de cor amarelo-alaranjado, lida a 440nm. Os aminoácidos são quantificados em um único colorímetro de dois canais e registradas as áreas dos picos da amostra-problema, obtidas através de dois programas próprios do sistema, o BIOCHROM e o EZECHROM. Após a digitação dos comandos adequados, foram quantificados em comparação com as de uma mistura-padrão de aminoácidos, injetada antes das amostras. O tempo necessário de corrida foi de 50 minutos por amostra, com intervalo de 10 minutos entre elas para estabilização da coluna. Utilizou-se uma planilha do programa EXCEL, para obtenção do resultado final da concentração de cada aminoácido nas silagens, levando-se em consideração as áreas correspondentes a cada aminoácido das amostras e às dos padrões encontradas.

3.5.3.3 Obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos

A determinação de ácidos graxos, através dos ésteres metílicos, teve como referência o procedimento de MAIA (1992), descrito no item seguinte.

Aproximadamente 50 mL do extrato lipídico, foram concentrados em evaporador rotativo até completa evaporação do solvente. Em seguida foi pesado, em um tubo de vidro de 30 mL, com tampa de rosca, cerca de 100 mg de lipídios da amostra, sendo adicionados 4 mL da solução 0,5 M de hidróxido de potássio em metanol anidro. Depois, o tubo foi agitado, tampado e colocado em banho-maria por 4 min, agitando-se ocasionalmente. Após o referido período, o tubo foi retirado do banho e resfriado em água corrente. Na etapa seguinte, foram adicionados ao tubo 5 mL do reagente de esterificação. Este reagente foi preparado misturando-se 20 g de cloreto de amônia, 600 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo foi tampado, agitado e levado ao banho-maria por 5 minutos. Após o esfriamento, foram ainda adicionados 4 mL de solução salina saturada (36%), sendo o mesmo tampado e agitado vigorosamente por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 5 mL de éter de petróleo, agitando-se vigorosamente por 30 segundos. Após 30 minutos, a parte superior do material, contendo os ésteres metílicos dos ácidos graxos (fase orgânica), foi transferida com o auxílio de uma pipeta, para recipientes de vidro com capacidade de 3 mL. O recipiente devidamente etiquetado foi hermeticamente fechado por tampas de alumínio recobertas com teflon e colocado sob refrigeração a 4°C, para posterior injeção no cromatógrafo de gás.

3.5.3.3.1 Condições cromatográficas

Para a análise cromatográfica foi utilizado um cromatógrafo Hewlett 5890 Packard, série II, com detector seletivo de massa. O material da análise foi separado em coluna capilar medindo 30m e 0,25mm de diâmetro e contendo DB-5-Dimethylpolysiloxane como fase estacionária na forma de um filme de 0,1 µm de espessura. O aquecimento da coluna foi programado para elevar a temperatura de 35°C para 180°C à razão de 4°C/min. E de 180°C para 280°C à razão de 20°C/minuto.

As amostras foram analisadas injetando-se soluções contendo os ácidos graxos esterificados. Os dados obtidos nesta análise eram compostos por

cromatogramas e mapas de abundância de massa dos fragmentos moleculares analisados no detector de espectroscopia de massas. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados com o tempo de retenção dos padrões equivalentes sobre condições identificadas. A composição dos ácidos graxos foi expressa como porcentagem de ácidos graxos totais.

3.6 - Análises microbiológicas

Foram realizados os seguintes testes microbiológicos de acordo com os padrões aprovados pela (APHA, 1992):

- 1 – Contagem Padrão em Placas
- 2 – Coliformes totais (NMP)
- 3 – Coliformes Fecais (NMP)
- 4 – Pesquisa de *Staphylococcus aureus*
- 5 – Pesquisa de *Salmonella ssp.*

3.7– ENSAIO BIOLÓGICO

3.7.1 - Ingredientes

Para a realização do ensaio biológico foram utilizados, para a formulação das dietas, os seguintes ingredientes comerciais: amido de milho (Maisena), óleo de milho comercial (Mazola), sacarose (açúcar refinado União), fécula de trigo, caseinato de cálcio (Indústria Nuteral) e premix (mistura mineral e vitamínica da marca FRI-LAB), específico para rações para ratos de laboratório. A composição do premix está em anexo.

3.7.2 - Animais

Para o ensaio biológico foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) variedade albinus, linhagem wistar, machos de 25 dias de idade, com uma variação de peso não mais que 5% dentro e entre os grupos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

3.7.3 - Formulação das dietas

Para a realização do ensaio biológico, foram utilizadas 5 dietas: protéica, silagem nova (30 dias) silagem velha (90 dias); aprotéica, e comercial, sendo que 4 foram formuladas de acordo com os procedimentos descritos pela AOAC (1975), com exceção da ração comercial. A composição das diferentes formulações está mostrada na Tabela 01 e na Figura 07.

Tabela 01 - Formulação básica para o preparo das dietas utilizadas nos ensaios biológicos, segundo AOAC (1975)

COMPONENTES	PROTÉICA	APROTÉICA
Proteína %	10	0
Gordura (óleo de milho comercial)	8	8
Premix (vitamínico-mineral)	3	3
Sacarose (açúcar refinado comercial)	1/3*	1/3*
Amido (amido de milho comercial)	2/3*	2/3*

* do peso para 100.

3.7.4 - Procedimento de ensaio

Os ratos recém-desmamados, antes de receberem as dietas testes eram submetidos a um período de adaptação de 10 dias, nos quais eram alimentados com dieta comercial e água *ad libitum*. Neste período, foram mantidos

individualmente em gaiolas plásticas, tipo caixa, forradas com camas constituídas de raspas peneiradas de madeira pinho, as quais foram colocadas em estantes. A limpeza das camas, renovação da água das mamadeiras e a reposição das rações eram feitas a cada três dias.



Figura 07 – Dieta peletizada



Figura 08 – Ensaio biológico

A temperatura ambiente estava dentro da faixa de neutralidade térmica para o rato ($22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa entre 50 – 60%, com ciclos de luz artificial de 12 horas, alternados. (Figura 08).

Ao final do período de adaptação os ratos eram pesados antes da introdução das dietas testes. A distribuição dos ratos nos grupos que receberam os diferentes tratamentos foi inteiramente ao acaso. Cada grupo era composto de 8 animais. O período do ensaio biológico com as dietas testes constou de 15 dias sendo que a cada 5 dias eram feitas: pesagem dos animais; limpeza das gaiolas e renovação de água. O ensaio teve como finalidade avaliar nutricionalmente o uso da silagem A (90 dias) e silagem B (30 dias) tendo como parâmetros o ganho de peso, o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e a ingestão de dietas testes.

3.7.5 – Delineamento Estatístico

O delineamento estatístico experimental utilizado nos ensaios biológicos foi inteiramente casualizado (PIMENTEL GOMES, 1985). Para comparação entre médias foi feita Análise de Variância (ANOVA) e, se diferentes do teste F, analisadas de acordo com Tukey (CAMPOS, 1984)

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Rendimento

Foi observado que o rendimento encontrado após a secagem da silagem biológica úmida foi de 50% no produto final.

4.2 - Características organolépticas

Pelo exame visual da silagem biológica úmida, observou-se uma alteração na massa, levando a uma forma pastosa que se manteve até o final da fase úmida, que de acordo com HAARD *et al.* (1985), é decorrente do processo contínuo de hidrólise da proteína do pescado.

Tabela 02 - Características organolépticas da silagem biológica úmida de resíduos de pescado

<i>Parâmetros</i>	Características organolépticas
Cor	Castanho escuro
Odor	Cheiro suave de ácido
Textura	Cremosa

A silagem manteve uma coloração marrom castanho a marrom róseo, com textura firme e viscosa e odor natural de peixe, sendo que ao final do terceiro dia, o odor se assemelhava ao de sardinha em conserva, mantendo até o sexto dia essas características. BACKHOFF (1976), trabalhando com a silagem biológica de resíduos de pescado, faz referências à classificação como de boa qualidade uma silagem que apresente odor ácido suave, cor tendendo para o marrom ou cinza claro, consistência líquida-pastosa ou líquida, sabor ácido suave e ligeiramente amargo, que coincide com as características da silagem obtida.

4.3 – Composição centesimal

Vários fatores são responsáveis pelas variações na composição centesimal das silagens, tais como – tipo de resíduo, espécie de pescado, tipo de peixe e métodos de processamento das silagens.

Observando ambas tabelas 03 e 04 podemos verificar diminuições dos teores de umidade, proteínas e gordura, na etapa de bioconversão dos resíduos para a silagem úmida. Com relação a umidade, esse decréscimo se deve a incorporação da farinha de trigo ao resíduo triturado. No caso da proteína bruta, os teores mais baixos obtidos para a silagem úmida, podem ser atribuídos a hidrólise protéica ocorrida durante o processo fermentativo. Enquanto que para os lipídios a diminuição pode estar também relacionada a uma hidrólise dos glicerídeos, possivelmente causadas por enzimas presentes no processo.

Tabela 03 – Composição centesimal da silagem biológica de resíduos de pescado durante as fases de processamento (Silagem A)

Determinação (%)	Resíduo	Silagem Úmida	Silagem Seca	Silagem A (90 dias)
Umidade	71,55	51,18	6,69	7,85
Proteína	15,66	12,54	20,68	21,40
Lipídios	4,24	4,14	5,26	6,64
Cinzas	5,45	6,70	11,49	15,51
Carboidratos ¹	-	25,44	55,88	48,60
Valor calórico ²	-	189,18	353,58	339,22

¹ Carboidratos determinados por diferença

² Kcal de Silagem Biológica/100g

Tabela 04 – Composição centesimal da silagem biológica de resíduos de pescado durante as fases de processamento (Silagem B)

Determinação (%)	Resíduo	Silagem Úmida	Silagem Seca	Silagem B (30 dias)
Umidade	64,70	47,56	7,08	7,16
Proteína	15,88	11,93	21,08	21,57
Lipídios	4,62	4,50	5,01	5,04
Cinzas	4,91	8,49	13,47	13,65
Carboidratos ¹	-	27,52	53,36	52,58
Valor Calórico ²	-	198,30	342,85	341,96

¹ Carboidratos determinados por diferença

² Kcal de Silagem Biológica/100g

A elevação do teor de cinzas na silagem úmida, foi semelhante aos resultados encontrados por MORALES-ULLOA *et al.* (1995) que atribuem esse aumento, ao processo de acidificação que contribui para uma melhor desintegração de ossos e escamas, antes presentes de forma intacta no resíduo.

MORALES-ULLOA *et al.* (1995), trabalhando com silagem enzimática, obteve após duas semanas de formulação 55,94% para a umidade, valor próximo ao encontrado neste trabalho; enquanto os teores protéicos das silagens A e B ficaram abaixo do citado por MANIKANDAVELU *et al.* (1992), que encontrou 17% de proteína na base úmida em silagem fermentada com 15% de melaço.

Após o processo de secagem (Tabelas 3 e 4) os teores da umidade em ambas silagens sofreram uma diminuição brusca, sendo bastante favorável por concentrar e, conseqüentemente elevar, os teores de proteína, gordura, cinzas e carboidratos.

Nota-se que tanto a silagem A (90 dias) quanto a silagem B (30 dias) apresentaram um aumento na sua composição após armazenamento (Tabelas 3 e 4).

DAPKEVICIUS et al (1997) afirmaram que principalmente as proporções de gordura e proteína na matéria seca se elevam durante a estocagem devido a utilização de carboidratos durante o processo de fermentação.

ARECHE *et al.*,(1987) afirmou que a silagem produzida por fermentação láctica possui estabilidade que garante armazenamento à temperatura ambiente em recipientes fechados durante um ano ou mais, sem que apresentem mudanças que impliquem em alterações ou modificação de suas características físico organolépticas.

4.4 – Análises físico-químicas

4.4.1- pH – Fermento biológico

O Gráfico 01 mostra as variações ocorridas no pH durante a preparação do fermento biológico.

No início da elaboração, o pH inicial foi de 4,2 sendo que, após 72 horas incubado, o fermento já começava seu estágio de estabilização alcançando um pH de 3,3 e mantendo-se assim, até o final do período.

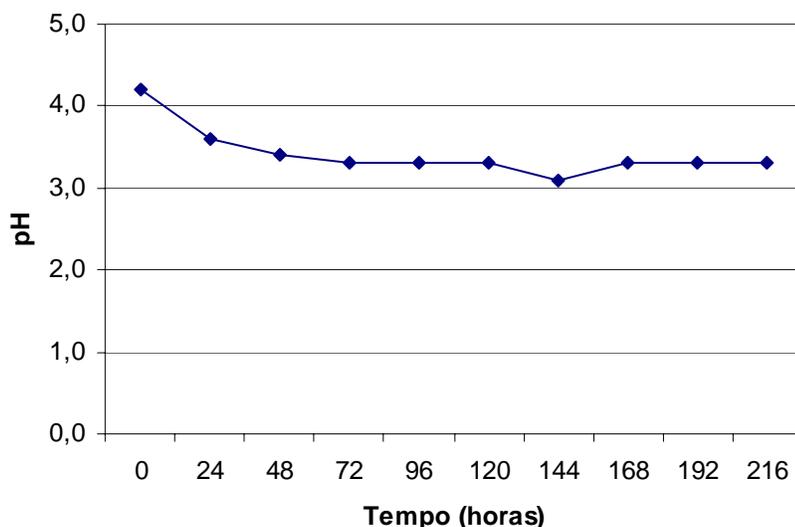


Gráfico 01 – Variação do pH durante a preparação do fermento biológico.

4.4.2 - pH - Silagem

O fermento biológico com pH 3,3 foi incorporado ao resíduo triturado de pescado com pH 6,5, adicionado de farinha de trigo e sal. A mistura, após homogeneização completa apresentou um decréscimo de pH para 5,9. Este fato é explicado por ARECHE *et al.* (1987) que afirmaram que o uso do fermento biológico permite efetuar variações do pH da mistura do triturado de peixe, farinha de trigo e sal. As bactérias produtoras de ácido láctico, utilizam a farinha de trigo como fonte de carboidratos produzindo também pequenas quantidades de CO₂ além de outros ácidos orgânicos

Depois de 24 horas de elaborada, a silagem úmida apresentou pH 5,6 e ao completar 96 horas, apresentou um pH estável em torno de 4,5. Segundo BACKHOFF (1976) as variações do pH podem ser causadas pela diferente microbiota desenvolvida segundo a temperatura de incubação. Os resíduos de pescado contém uma variedade de microrganismos que exercem trocas na

composição da silagem. A silagem, após o processo de secagem manteve seu pH em 4.1.

4.4.3 - Acidez expressa em ácido láctico

No final da obtenção da silagem biológica úmida, quando a mesma estava no seu sexto dia de fermentação, a medição da acidez mostrou um resultado de 4,3% expresso em ácido láctico.

4.5 – Caracterização nutricional

4.5.1 – Perfil de minerais

Os resultados obtidos na determinação de minerais das silagens A e B estão apresentados na Tabela 05.

Tabela 05 – Composição mineral das silagens biológicas de resíduos de pescado A e B.

Elemento	Silagem B (30 dias)	Silagem A (90 dias)
Cálcio	9,1	8,6
Fósforo	12,60	22,90
Magnésio	3,3	0,6
Ferro (2)	134,8	115,7
Zinco (2)	10,7	28,0
Manganês (2)	9,4	7,5
Cobre (2)	17,5	6,15

(1) g/kg (macronutrientes); (2) mg/kg (micronutrientes)

Os minerais analisados classificados como macronutrientes (Ca, P, Mg) tiveram seus valores expressos em g/kg enquanto os micronutrientes (Fe, Zn, Mn e Cu) foram expressos em mg/kg.

É possível observar uma pequena variação nos teores dos minerais nas diferentes silagens. É provável que essa diferença não seja decorrente dos diferentes períodos de elaboração e sim, devido a variação de partes dos resíduos utilizados para a preparação da silagem. Os resíduos foram compostos por guelras, vísceras, pele, esqueleto, escamas, restos musculares e, a proporção dos minerais nessas partes pode influenciar na presença dos minerais no produto final, visto que a distribuição destes minerais ocorre em diferentes partes do corpo do animal. O Ca e P se acumulam principalmente no esqueleto e escamas enquanto as vísceras e as peles possuem taxas muito baixas.

Vale salientar que os resultados encontrados neste trabalho são aproximados dos comentados por GRENN (1984) para Ca (0,7 a 1,65 mg/100g de silagem), P (0,4 a 2,0 mg/100g de silagem) e Mg (0,5 a 1,05 mg/100g de silagem).

4.5.2 – Perfil de aminoácidos

A Tabela 06 apresenta os resultados das análises de aminoácidos das silagens biológicas de resíduos de pescado elaborados em diferentes períodos: Silagem A (90 dias) e silagem B(30 dias).

Tabela 06 – Aminoácidos (g/100g de proteína) das silagens biológicas de resíduos de pescados com 90 dias (Silagem A) e 30 dias (Silagem B) de elaboração.

Aminoácido	Silagem A (90 dias)	Silagem B (30 dias)
Ácido aspártico	8,38	8,54
Treonina	2,70	2,61
Serina	3,21	3,91
Ácido glutâmico	29,36	28,08
Glicina	9,95	10,39
Alanina	6,19	4,67
½ Cisteína	5,96	5,04
Valina	4,58	4,10
Metionina	1,34	1,30
Isoleucina	2,52	2,28
Leucina	7,16	6,08
Tirosina	1,52	1,29
Fenilalanina	2,76	2,13
Histidina	1,30	1,27
Lisina	4,50	5,95
Arginina	3,76	4,28
Prolina	4,75	8,01

Em geral, a análise dos resultados obtidos nos aminogramas em estudo aproximam-se dos valores obtidos por MORALES-ULLOA & OETTERER (1993) quando produziram silagens biológicas em diferentes períodos de fermentação.

Quando comparada a composição em aminoácidos das silagens com 90 e 30 dias de elaboração, nota-se de uma maneira geral uma tendência mínima na variação dos teores de aminoácidos. Somente a prolina e a lisina apresentaram

acentuadas diminuições nos períodos estudados. Para JONHSON *et al.* 1985 a redução no teor de aminoácidos pode ocorrer provavelmente, devido as reações entre os grupos α -amínicos e os grupos aldeídos.

O ácido glutâmico é o aminoácido que apresentou maiores teores em ambas silagens. Foi verificado uma maior concentração desse aminoácido na silagem com 90 dias. Este resultado, está de acordo com o estudo feito por JAMES *et al.* (1987) em silagens biológicas de pescado, os quais afirmam haver uma tendência ao aumento do teor desse aminoácido em silagens biológicas com o prolongado tempo de estocagem.

A Tabela 07 compara os resultados obtidos para os aminoácidos essenciais com o padrão da FAO (1987).

Com relação aos aminoácidos essenciais (Tabela 07) o maior valor encontrado foi para a leucina. Os teores encontrados para os dois períodos, estiveram próximos do padrão considerado pela FAO (1987).

Tabela 07 – Aminoácidos essenciais contidos nas silagens biológicas de resíduos de pescado, A (90 dias) e B (30 dias) comparados com o padrão FAO, em g/100g de proteína.

Aminoácido	Silagem A (90 dias)	Silagem B (30 Dias)	FAO *
Leucina	7,16	6,08	7,00
Lisina	4,50	5,95	5,50
Fenilalanina + Tirosina	4,28	3,42	6,00
Isoleucina	2,52	2,28	4,00
Treonina	2,70	2,61	4,00
Valina	4,58	4,10	5,00
Metionina	1,34	1,30	3,50

Fonte: DI CESARE (1987)

Para STROM & EGGUM (1981) o mais importante do ponto de vista nutricional da silagem são os níveis de lisina, cistina e metionina.

Considerando-se o aminoácido lisina, na Tabela 07, pode-se observar que este manteve seus valores acima do estipulado pela FAO (1987) na silagem com 30 dias, sendo que a silagem com 90 dias apresentou teores inferiores ao padrão.

Para a treonina o valor encontrado é semelhante ao relacionado ao concentrado protéico de pescado elaborado por MARTIN *et al.* (1992), enquanto a metionina alcançou valores mais elevados.

4.5.3 – Perfil de ácidos graxos

O cromatograma da silagem B (30 dias), (Fig.) mostrou 15 picos principais, dos quais foi possível caracterizar o pico 1 como o éster metílico do ácido mirístico ($C_{14}:0$, 6,4%) (Fig.); o pico 2 como o éster metílico do ácido palmitoleico ($C_{16}:1$, 34,09%), o pico 3 como o éster metílico do ácido palmítico ($C_{16}:0$, 8,07%); o pico 4 como o éster metílico do ácido oléico ($C_{18}:1$, 24,71%) e o pico 5 como o éster metílico do ácido esteárico ($C_{18}:0$, 12,68%), somando 80,19% da composição total. Os demais ésteres metílicos de ácidos graxos não foram caracterizados completamente por espectrometria de massa, por se apresentarem em pequenas proporções; perfazendo um total de 14,05%.

O cromatograma da silagem A (90 dias) (Fig.) mostrou 5 picos principais, dos quais foi possível caracterizar o pico 1 como o éster metílico do ácido mirístico ($C_{14}:0$, 10,15%) (Fig.), o pico 2 como o éster metílico do ácido palmitoleico ($C_{16}:1$, 11,24%), o pico 3 como o éster metílico do ácido palmítico ($C_{16}:0$, 48,87%), o pico 4 como o éster metílico do ácido oléico ($C_{18}:1$, 16,10%) e o pico 5 como o éster metílico do ácido esteárico ($C_{18}:0$, 13,64%) totalizando 100% dos ésteres metílicos caracterizados.

A comparação dos dados obtidos nos cromatogramas das silagens A e B, revelou a presença dos ácidos mirísticos, palmitoleico, palmítico, oléico e esteárico em ambos períodos de armazenamento, sendo o ácido palmítico, o constituinte principal. De acordo com a literatura pesquisada pode-se verificar nos óleos de pescado um teor sempre elevado de ácido palmítico, variando entre 15 a 20% (FENEMA,1985)

SALES (1995) trabalhando com silagem química de tilápias do Nilo, determinou o perfil de ácidos graxos encontrando resultados que se assemelham aos valores aqui mencionados, com relação ao C₁₄:O (4,44%), C₁₆:O(20,07%) e C₁₆:1 (12,91%).

LUSTOSA NETO (1994) encontrou no conteúdo de ácidos graxos, dos óleos dos ensilados secos de resíduo de pescado, da família *Lutjanidae* valores muitos próximos aos obtidos para a silagem B (30 dias) para os seguintes ácidos C₁₄:O (6,8%), C₁₆:O (31%), C₁₆:1 (55%), C₁₈:O (12,5%) e C₁₈:1 (23%).

Os valores dos constituintes dos ésteres metílicos dos ácidos graxos encontrados nas silagens biológicas de resíduos de pescados secos, para as silagens A e B estão mostrados na Tabela 08.

Tabela 08 – Valores obtidos das composições químicas das frações lipídicas das silagens A e B.

Constituinte (éster metílico do)	Silagem A (90 dias)	Silagem B (30 dias)
Ácido mirístico (C ₁₄ :0)	10,15	6,4
Ácido palmítico (C ₁₆ :0)	48,87	34,09
Ácido palmitoleico (C ₁₆ :1)	11,24	8,07
Ácido esteárico (C ₁₈ :0)	13,64	12,68
Ácido oléico (C ₁₈ :1)	16,10	24,71
* não caracterizados	-	14,05
Total	100,00	100,00

4.6 – Análises microbiológicas

A Tabela 09 apresenta os resultados das análises microbiológicas efetuadas nas silagens A (90 dias) e B (30 dias) processadas. As amostras foram coletadas da silagem biológica seca para realização das seguintes provas: Contagem Padrão em Placas (CPP), Número Mais Provável para Coliformes Totais (NMP), Número Mais Provável para Coliformes Fecais (NMP), Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e Pesquisa de *Salmonella ssp.*

Tabela 09 – Contagem Padrão em Placas (CPP) de bactérias, Número Mais Provável (NMP) de Coliformes totais e Coliformes fecais, pesquisa para *Staphylococcus aureus* e pesquisa para *Salmonella spp.*, em amostras de silagem biológica de resíduos de pescados com 90 e 30 dias de processamento.

Análise	Silagem A	Silagem B
	(90 dias)	(30 dias)
CPP ¹	12 X 10 ²	3 X 10 ²
NMP Coliformes Totais	Ausência	Ausência
NMP Coliformes Fecais	Ausência	Ausência
Pesquisa de <i>S. aureus</i>	< 10 ²	< 10 ²
Pesquisa de Salmonellas	Ausência	Ausência

(¹) Resultados em Unidades Formadoras de Colônias/grama(UFC/g)

Tanto os peixes de água doce como os de água salgada contêm níveis de proteína e outros componentes nitrogenados comparativamente elevados (JAY, 1986). Devido a isso são considerados meios ricos para a multiplicação microbiana.

A legislação vigente (portaria nº 451, de setembro de 1997 do Ministério da Saúde) não estabelece padrões microbiológicos para silagem de pescado, por

isso toma-se como base os parâmetros existentes para peixe fresco. As bactérias consideradas como de interesse para a Saúde Pública, no caso de pescado fresco são: Coliformes Fecais, NMP = 10^2 /G e *Salmonella* = ausência em 25 g.

Pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 09, valores muito baixos em relação a contagem de bactérias e, ausência para Coliformes fecais, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* tanto na silagem A (90 dias) quanto na silagem B (30 dias).

KOMPIANG *et al.* (1981) observaram que, durante o armazenamento da silagem de pescado, só há presença de bactérias ácido-lácticas, indicando que os microrganismos patogênicos tais como os Coliformes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* ssp. encontram-se restringidos pelo baixo pH do produto. Nos produtos pesqueiros ensilados (pH 4.0) deve ser considerada a ação bacteriostática da acidez que proporciona uma maior segurança a esse tipo de produto.

4.7 – Ensaio biológico

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10 pode-se observar que não, houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao ganho de peso entre as dietas do tratamento protéico (caseinato de cálcio) e do tratamento com a ração comercial. No entanto, quando comparados com os tratamentos contendo nas dietas, as silagens A (90 dias) e B (30 dias) foram significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Tabela 10 – Médias do ganho de peso, Ingestão da dieta e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) da proteína para as dietas experimentais dos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Ganho de peso (g)	Ingestão de Dieta (g)	CEA
T1= Caseinato de cálcio	59,13 a	247,25	0,23a
T2 = Silagem B (30 dias)	42,12b	237,87	0,17c
T3 = Silagem A (90 dias)	8,1 c	137,62	0,05d
T4 = Comercial (FRI-LAB)	57,13 a	276,50	0,20b

É possível também observar que os T2 e T3 foram estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$). O grupo de ratos alimentados com a dieta que continha a silagem B (30 dias) teve ganho de peso mais elevado do que o grupo alimentado com a dieta contendo a silagem A (90 dias). Esses resultados confirmam dados de STROM e EGGUM (1981) onde dietas compostas por silagens recém preparadas se mostraram superiores as dietas compostas por silagens armazenadas por vários meses. Os mesmos autores afirmam que a armazenagem prolongada pode ocasionar baixo valor nutricional, devido poder haver destruição dos aminoácidos essenciais, provavelmente por interações com os lipídios oxidados, permitindo o desenvolvimento de substâncias tóxicas (BERTULLO, 1989), o que explica o baixo valor nutricional encontrado na silagem A (90 dias), como ficou demonstrado através da baixa utilização da proteína dietética para ratos. (Ver Gráfico 02).

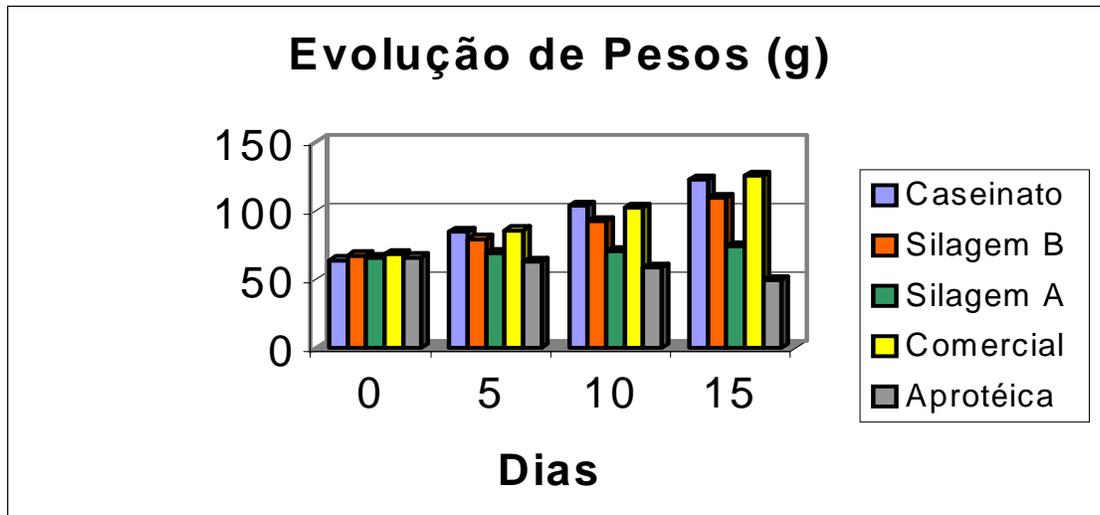


Gráfico 02 – Evolução do Ganho de Peso durante o ensaio biológico.

Quanto à ingestão de dietas, as médias para os tratamentos T4 e T1 foram as mais altas durante o experimento, de 276,5g e 247,25g, respectivamente. O T2 apresentou média de ingestão de 237,87 enquanto o T3 teve a menor ingesta, 137,62g.

SALES (1995), em seu experimento com formulação de silagens química de resíduos de tilápia do Nilo, elaborou dietas compostas por caseína, silagem antiga (90 dias), silagem nova (30 dias) e tendo como ração de referência – NUVILAB – constatou que as dietas compostas de caseína e ração comercial, foram estatisticamente iguais e superiores às dietas contendo silagens de 30 e 90 dias sendo que, a silagem antiga foi a que apresentou um menor índice de ingestão.

GUEVARA *et al.* (1991), avaliando silagem biológica como suplemento protéico em dietas para frangos de engorda, observaram valores de consumo diferenciados para as dietas testadas (controle, farinha de pescado 5%, silagem a 2,5% e silagem a 5%) a partir da segunda semana do experimento. Detectaram

que o maior consumo foi o da dieta com silagem a 5%, demonstrando uma alta aceitabilidade dessa dieta pelas aves. Segundo os autores, os frangos mostram preferência por dietas com maior conteúdo de proteína animal.

Com relação ao Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) (Tabela 10) das dietas experimentais, o T4 - ração comercial - foi o que apresentou um melhor desempenho (0,20), seguido do T2 - silagem 30 dias - (0,17) e por último o T3 - silagem 90 dias - (0,05). Todos os tratamentos apresentaram um CEA inferior ao do T1 (caseinato de sódio) 0,23) e diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$).

MORALES-ULLOA *et al.* (1995), utilizando em ensaio biológico com ratos, silagens microbianas com diferentes tempos de fermentação, encontraram nas três dietas testadas, coeficientes de eficiência alimentar próximos dos citados nesta pesquisa, sendo eles para dieta I - silagem meio inóculo de *L. plantarum* + silagem meio inóculo de *P. acidilactici* (0,22), dieta II - silagem meio inóculo de *L. plantarum* + silagem meio inóculo de *P. acidilactici* + melão - (0,09) e dieta III - silagem solução inóculo de *L. plantarum* + silagem solução inóculo de *P. acidilactici* + melão (0,14) e para a caseína (0,31). Todos os coeficientes foram significativamente diferentes entre si. Segundo a análise estatística, o melhor coeficiente de eficiência alimentar ficou com o grupo alimentado com silagem recém preparada CEA (0,22), porém nenhuma das dietas tiveram coeficiente de eficiência alimentar superior ao da caseína que foi o tratamento controle.

SALES (1995) encontrou coeficientes de eficiência alimentar em dietas compostas por silagem química com diferentes períodos de elaboração (30 e 90 dias), testadas em grupos de ratos e verificou estatisticamente ser o CEA (0,26) da ração comercial superior ao da silagem nova (30 dias) (0,20) e desta, superior ao da silagem antiga (90 dias) (0,10), concluindo ser o da silagem antiga, estatisticamente inferior em relação as demais dietas analisadas.

5 – CONCLUSÕES

- A silagem obtida de resíduo de pescado e elaborada por método biológico mostrou ser um produto alternativo de qualidade e concentração protéica satisfatória para utilização como ingrediente na alimentação animal.
- O método biológico de processamento de silagem é de fácil técnica e de baixo custo, principalmente quando utiliza como veículo de fermentação, o fermento biológico formulado a partir de restos vegetais.
- A silagem biológica após secagem apresentou elevação nos teores dos nutrientes.
- Os teores de aminoácidos, ácidos graxos, minerais nas silagens com 30 e 90 dias estão próximos dos requerimentos exigidos na alimentação animal.
- A diferença do ganho de peso dos animais alimentados com a silagem B (30 dias) em comparação com a ração comercial, pode está relacionada à maior concentração protéica existente na marca comercial, sendo sugerido um aumento de proporção da silagem B nas rações.
- A silagem A com 90 dias de elaboração apresentou características iniciais de processo oxidativo – escurecimento e odor acentuados, que pode ter contribuído para uma menor ingestão e conseqüentemente, baixo ganho de peso pelos animais em experimento.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. Washington, 1992. 1219p.

ARECHE, T. N., BERENZ, V. Z. **Ensilados de pescado utilizando bacterias laticas (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*)**. Peru: Instituto Pesquero del Peru, 1987. 26p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists**. 12 ed. Washington. 1975, 620p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists**. 14 ed. Washington. 1984, 620p.

BACKHOFF, H.P. Some chemical changes in fish silage. **J. Food. Technol.**; v.11, p.353-63, 1976.

BANNATYNE, W. R., THOMAS, J. Fatty acid composition of New Zealand shellfish lipids. **N. Z. J. Sa.**, 12, p.207-212. 1969.

BERAQUET, N. J., GALACHO, S. A. A. Composição, estabilidade e alterações na fração proteica e no óleo de ensilados de resíduos de peixe e camarão. **Colet. ITAL**, v.13, p. 149-174, 1983.

BERTULLO, E. Desarrollo del ensilado de pescado en America Latina. In: **CONSULTA DE EXPERTOS SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUCTOS PESQUEROS EN AMERICA LATINA. 2**. Montevideo. Roma: FAO. 1989.

- BOBBIO, F. O., BOBBIO, P.A. Proteínas e aminoácidos. In: BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à Química dos Alimentos**. 2ed. São Paulo: Varela, cap. 2, p. 71-108. 1989.
- CAMPOS, H. **Estatística aplicada à experimentação com cana-de-açúcar**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1984.
- CANONIZADO, S. The status of fish silage research in the Philippines. In: **Fish silage production and its use**. FAO Fish. Rep. Roma, 230p. p.24-26, 1980.
- CHAMPE, P. C., HARVEY, R. A. **Bioquímica Ilustrada**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 446p.
- CONN, E. E., STUMPF, P. K. Aminoácidos e proteínas. In: CONN, E. E.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. 5.ed. São Paulo: Edgard Bliicher, cap. 4, p.62-92, 1990.
- CONTRERAS-GUSMÁN, E. S. **Bioquímica de Pescados e Derivados**. Jaboticabal: FUNEP. 1994, 409p.
- DAPKEVICIUS, M.L.E., BATISTA, I., NOUT, M.J.R., ROMBOUTS, F.M., HOUBEN, J.H. lipid and protein changes during the ensilage of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) by acid and biological methods. **Food Chemistry**, v.63, n.1, p. 97-102, 1998.
- DI CESARI, L. F. Fish protein concentrate from anchovies. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.18, p.347-378, 1987.
- DISNEY, J.G., HOFFMAN, A. A dried fish silage product. In: **PROCEEDINGS OF THE TORRY RESEARCH STATION SYMPOSIUM ON FISH SILAGE**, Aberdeen, v. 1-13, 1976.

- DISNEY, J.G., JAMES, D. Fish silage production and its use. Roma: FAO – **Fishery Report**, 230. 1979, 105p.
- EXLER, J.; KINSELLA, J.E., WATT, B.K. Lipids and fatty acids of important finfish: New data for nutrient tables. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 52, p.154-159. 1975.
- FAO, Roma – **Necessidades de energia y de proteínas**. Roma: FAO/OMS, 1973. 138p. (FAO/OMS – Reuniones sobre nutrición, 52).
- FENNEMA, O.R. **Introducion a la ciência de los alimentos**. Barcelona: Ed. Reverté S.A., 1985, 445p.
- FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu. 1996, 182p.
- FRANCO, G. **Nutrição**. Tabela de composição química dos alimentos. Rio de Janeiro. Ed. Atheneu. 1992. p.107.
- GEIGER, E.; BORGSTROM, G. In: BORGSTROM, G. ed. **Fish as food**. New York: Academic Press, v. 2. p. 74-92, 1962.
- GREEN, S. **The use of fish silage in pig nutrition**. **University of Nottingham**. 1984, 230p. (Tese de doutorado)
- GUEVARA Y., BELLO, R.A., MONTILLA, J. Evaluación del ensilado de pescado elaborado por via microbiológica como suplemento proteico en dietas para pollos de engorde. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.41, n.2, p. 246-256, 1991.
- HAARD, N.F., KARIEL, N.,HERZBERG, G., FELTHAM, L.A.W., WINTER, K. Stabilization of protein and oil in fish silage for use as a ruminant feed suplement. **J. Sci. Food Agric.**, v.36, p.229-241, 1985.

- HALL, G.M., LEDWARD, D.A. Silage from tropical fish 3. Lipid behaviour. **J. Food Technol.**, v.21, p.45-54. 1986.
- HALL, G.M., LEDWARD, D.A., LAWRIE, R.A. Silage from tropical fish 2. Undigested fraction. **J. Food Technol.** v.20, p.573-580. 1985a.
- HIETALA, P.K., WESTERMARCK, H.W., JAARMA, M. Identification of antimicrobial alpha-hydroacids in *Lactobacillus plantarum* – Fermented animal protein. **Nutr. Metab.**, v.23, n.3, p.227-234, 1979.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** Métodos químicos e físicos de análise de alimentos, v. I. São Paulo. 1985, 317p.
- JACKSON, A.J., KERR, A.K., COWEY, C.B. Fish silage as a dietary ingredient for salmon: nutritional and storage characteristics. **Aquaculture**, v.38, p.211-220, 1984.
- JACQUOT, R. Organic constituents of fish and other aquatic foods. In: Borgstram, G (E.d). **Fish as food.** London: Academic Press, v.1, p.164,1961.
- JAMES, M.A., IYER, K.M., NAIR, M.R. Comparative study of fish silage prepared by microbial fermentation and formic acid ensilage. In: **CONFERENCE ON THE HANDLING PROCESSING AND MARKETING OF TROPICAL FISH.** Tropical Products Institute. P.273-275, 1977.
- JAY, J.M. Food spoilage. In: **Modern Food Microbiology.** New York: VNR Company. 3rded. p.191 – 238. 1986.
- JOHNSEN, F.; SKREDE, A. Evaluation of fish viscera as a feed resource. **Acta. Agric. Scand.** v.31, p.21-8, 1981.

- JOHNSON, R.J., BROWN, N., EASON, P., SUMNER, J. The nutritional quality of two types of fish silage for broiler chickens. **J. sci. Food Agric.**, v.36, n.11, p. 1051-1056, 1985.
- KOMPIANG, I.P. Fish silage, its prospect and future in Indonesia. **Indonesian Agric. Res. & Develop. J.** v.3, n.1, p.9-12, 1981.
- KRAUSE, M.V.; MAHAN, L.K. Proteína. In: KRAUSE, M. V.; MAHAN, L. K. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 6.ed. São Paulo: Roca, cap. 5, p.77-100, 1989.
- KRYZNOWEK, J., WIGGIN, K., DONAHUE, P. Sterol and fatty acid content in three groups of surf clams (*specula solidi ssima*), wild clams (60 and 120 mm size) and culturer clams (60 mm size). **Comp. Bioch. Physiol. (B)**, 74(2), p.289-293, 1983
- LESSI, E., XIMENES CARNEIRO, A.R., LUPIN, H.M. Obtención de ensilado biológico. In: FAO. **CONSULTA DE EXPERTOS SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUCTOS PESQUEROS EN AMERICA LATINA, 2**. Montevideo. 1989, 8p.
- LINDGREN, S., PLEJE, M. Silage fermentation of waste products with lactic acid bacteria. **J. Sci. Food Agric.**, v.34, p.1057-1067, 1983.
- LISTON, J. Avanços na tecnologia de pescados para melhor aproveitamento de espécies industrializadas de baixo valor comercial. **Boletim do ITAL**, Campinas, n. 53, p.1-20, 1977.
- LUPIN, H.M. **Ensilado biológico de pescado. Una propuesta para la utilización de residuos de la pesca continental en America Latina**. FAO, COPESCAL/93/10, 1983

- LUSTOSA NETO, D. A. **Elaboração e caracterização química, funcional e nutricional de ensilados de resíduos de pescado da família Lutjanidae**. Fortaleza: UFC. 1994, 77p. (Dissertação de Mestrado).
- MACKIE, I.M. Potential production of powdered and liquid fish products for human consumption and animal feed. In: **Technical Conference on Fishery Products**. Tokyo. FAO, April, 1973.
- MACKIE, I.M., HARDY, R., HOBBS, G. Poisson fermenté et produits dérivés. In: **Rapports de la FAO sur les peches**. Rome. 1971, 62p.
- MANDELLI, M.Q. A preservação ácida no aproveitamento econômico do pescado e dos resíduos de sua industrialização. **Equipescas J.**, v.44, p.47-52, 1972.
- MARTIN, A. M., PATEL, T.R. **Studies on the production of fish protein concentrates by biological methods**. St. Johns, New Foundland: MUN/ Food Science Program/ Department of Biochemistry, 1992, 77p. (Project Report)
- MARZZOCO, A., TORRES, B.B. Aspectos bioquímicos da nutrição. In: MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara, cap. 11, p. 165-171, 1990.
- MONTGOMERY, R., CONWAY, T.W.; SPECTOR, A.A. **Bioquímica: uma abordagem dirigida por casos**. 5.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1994. 477p.
- MORAIS, C., MARTINS, J. Considerações sobre o aproveitamento de sobras da industrialização de pescado na elaboração de produtos alimentícios. **Boletim do ITAL**, Campinas, v.18, n.3, p.253-281, 1981.
- MORALES-ULLOA, D. F., OETTERER, M. Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 3, p.206-214, 1995.

- MOSSEL, D.A. Physiological and metabolic attributes of microbial groups associated with food. **J. Appl. Bact.**, n. 34, p. 95-118, 1971.
- NEVES, A.G. de A.; VIEIRA, L.Q. Proteínas. In: VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G., MARES-GUIA, M. **Bioquímica Celular e Biologia Celular**. 2.ed. São Paulo: Ateneu,. cap. 4, p.45-76, 1991.
- NOGUEIRA JUNIOR, S., NEGRI NETO, A., TSUNECHIRO, A., OKANO, C., SATO, G. S., GIULIETTI, N., TAKAHASHI, N. S., TANAKA, R. T., DIEHL, S.R.L. **Alimentação animal: realidade e perspectivas (Coleção cadeias de produção da aquicultura)**. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Abastecimento. 1997, 95p.
- NUNES, M. L. Silagem de pescado. In: OGAWA, M., MAIA, E. L. (eds.). **Manual de Pesca**. São Paulo: Livraria Varela. Cap. 4, p.56-71, 1999.
- OETTERER DE ANDRADE, M. **O processo de fermentação do pescado (Anchovamento)**. Fortaleza: UFC/LABOMAR. 1991, 35p. (Monografia de especialização).
- OETTERER DE ANDRADE, M. Pescado fermentado. In: AQUARONE, E., BORZANI, W., LIMA, U. de A. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 176-202. 1983. (Biotecnologia, 5)
- OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado. **Alimentos e Nutrição**, v.5, p.199-234, 1993.
- OETTERER, M.; VALÉRIO, A.C.R.; SZENTTAMASY, E.R.; BARBOSA, S.M.B.; MORENO, I.A.M. Aproveitamento da biomassa residual da industrialização do pescado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 13., São Paulo: **Anais**. São Paulo: SBCTA, p. 140. 1992.

- OGAWA, M. Carboidratos, vitaminas e minerais. In: OGAWA, M., MAIA, E.L.(eds). **Manual de Pesca**. São Paulo: Livraria Varela. Cap. 4, p.56-71, 1999.
- OWENS, J.D., MENDOZA, L.S. Enzymically hydrolyzed and bacterially fermented fishery products. **J. Food Technol.**, v.20, p.273-293, 1985.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 11ed. Nobel. rev. ampl. Piracicaba. 1985. p.56-76.
- RAA, J., GILDBERG, A. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. **J. Food Technol.** v.11, p.619-628, 1976.
- RAA, J., GILDBERG, A. Fish silage: A review. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v 16. p.383-419, 1982.
- REECE, P. Control and reduction of free fatty acid concentration in oil recovery from fish silage prepared from sprat. **J. Sci. Food Agric.** v.31, p.147-55, 1980.
- RODRIGUEZ, T., MONTILLA, J.J., BELLO, R.A. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. I elaboración biológica. **Arch. Latinoam. de Nutr.**, v.40, n.3, p.426-438, 1990.
- SALES, R.O. **Processamento, caracterização química e avaliação nutricional da silagem da despesca da tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) em dietas experimentais com ratos**. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. Universidade de Campinas. 1995, 174p. (Tese de doutorado)
- SANCLIVIER, M. L'Industrie alimentaire halieutique. **ENSA (RENNES)**. V. II. p.308-366, 1985.

- SANTOS, A.L.L., AZEVEDO, J.L., CHOPIN, M.C. Streptococcus lácticos e seus bacteriófagos. **Boletim do ITAL**. Campinas. v.23, n.1, p.17-59, 1986.
- SATHE, S.K. DESHPANDER, S.S., SALUNKHE, D.K. Dry beans of phaseolus. Part 2: Chemical composition; carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. **CRC Crit. Rev. Food Sci. And Nutr.**, v.21, p. 41-93, 1984.
- SEAL, K.J. Animal wastes as source of biomass production. **Outlook on Agriculture**, Brackwell, v.21, n. 2, p.91-97, 1992.
- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição fator de saúde e desenvolvimento**. p.19 e 243. Ed. UNICAMP/ALMED, Campinas, São Paulo, 1987.
- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996, 517p.
- SHOEMAKER, S. The use of enzymes for waste management in the food industry. In: HARLANDER, S.K., LABUZA, T.P. **Biotechnology in food processing**. New Jersey: Noyes Publishing, p. 259-269, 1986.
- SMITH, K.J. Soybean meal: production, composition and utilization. *Feedstuffs* Jan. 17th, 1977, 22p.
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H., MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, v.30, p. 1190-1205, 1958.
- STANSBY, M.E.. Proximate composition of fish. In: Heen, F. e Kreuzer, R. (eds.), **Fish in nutrition**. London: Fishing News (Books) Ltd. p.55-60, 1962.
- STONE, F.E., HARDY, R.W. Nutrition value of acid stabilized silage and liquefied fish protein. **J. Sci. Food Agric**. v.37, p.797-803, 1986.

- STROM, T, EGGUM, B.O. Nutritional value of fish viscera silage. **J. Sci. Food Agric.** v.32, p.115-120, 1981.
- TATTERSON, I.N., WINDSOR, M.L. Fish silage. **J. Sci. Food Agric.** n.25, p.369-379, 1974.
- TATTERSON, I.N., WINDSOR, M.L. Fish silage. **J. Sci. Food Agric.** n.32, p.115-120, 1981.
- TELES, F.F.F. Proteína. In: TELES, F.F.F. **Bioquímica da Nutrição.** Parte I. Viçosa: UFV, cap. 2, p. 21-34. 1981.
- TENUTA FILHO, A. **Caracterização nutricional e funcional da proteína recuperada de cefalotórax de camarão rosa e estudo do aproveitamento do produto residual.** São Paulo: USP. 1983, 79p. (Tese de doutorado)
- THOMPSON, M.. Biochemical composition of fish. In: Firth, F.E.(ed.) **Encyclopedia of Marine Resources.** Van. Nostrand Reinhold Co. NY. 1969.
- UNITED NATION INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION – UNIDO. **Environmental management in fishery – based industries.** (Working papers in industrial planning, 5), 1991, 88p.
- VILLELA DE ANDRADE, M.F., FRANQUEIRA DA SILVA, J.M. Obtención de ensilado de residuo de sardinha, *Sardinella brasiliensis*(Steindachner, 1879) e su empleo en la formulación de raciones de minimo costo para aves. In: **CONSULTA DE EXPERTOS SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUCTOS PESQUEROS EN AMERICA LATINA 2.** Montevideo. Roma: FAO, 1989, 19p.
- WIGNALL, J., TATTERSON, I. **Fish silage.** Process. Biochemistry, Jan/Feb. 1977.

WINDSOR, M., BARLOWW, S. Introduction to fishery by products. In: **Fish Silage**. Chapter 5. U. K.: Fishing news Books. 1981.

XIMENES CARNEIRO, A.R. **Elaboração e uso de ensilado biológico de pescado na alimentação de alevinos de tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Manaus: INPA/FUA-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas. 1991, 81p. (Dissertação de Mestrado).