**ELABORAÇÃO DE SILAGEM
ENZIMÁTICA DE PESCADO COMO
ALTERNATIVA AO PROCESSO
TRADICIONAL**

ANA CLÁUDIA RUHNKE VALÉRIO

Economista Doméstica

Orientadora: Prof^a Dr^a. MARÍLIA OETTERER

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Julho - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

Valério, Ana Claudia Ruhnke

V164e Elaboração de silagem enzimática de pescado como
alternativa ao processo tradicional. Piracicaba,
1994.
101p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Pescado - Indústria - Tecnologia 2. Pescado -
Resíduo - Uso 3. Silagem de pescado - Tratamento enzi
mático I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei
roz, Piracicaba

CDD 664.94
636.08552

**ELABORAÇÃO DE SILAGEM
ENZIMÁTICA DE PESCADO COMO
ALTERNATIVA AO PROCESSO
TRADICIONAL**

ANA CLÁUDIA RUHNKE VALÉRIO

Aprovada em:

Comissão julgadora:

Dr^a MARISA A. B. REGITANO d'ARCE - ESALQ/USP

Dr^a SOLANGE G. CANNIATTI BRAZACA - ESALQ/USP

Dr^a MARÍLIA OETTERER - ESALQ/USP (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. MARÍLIA OETTERER

Orientadora

Ao meu marido e aos meus filhos, pelos momentos que sacrifiquei do seu convívio. Ao meu pai, pelo exemplo da honesta, dedicada e brilhante carreira universitária que empreendeu. À minha mãe, por poder contar sempre com o seu apoio, cooperação e amor em todas as aspirações e conquistas. Obrigada.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- À Professora Dr^a. Marília Oetterer, pela orientação, amizade e apoio no decorrer do curso e fase experimental desse trabalho.
- À amiga e Técnica de Laboratório Ivani Marchetto Moreno pelo apoio e ajuda técnica imprescindíveis nesse trabalho.
- À Doris Floridalma Morales Ulloa pela amizade, ajuda e colaboração nas práticas de laboratório.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelos equipamentos e auxílios financeiros que permitiram a execução da parte experimental.
- À Professora Dra. Jocelim Mastrodi Salgado e à Professora Dr^a. Solange Guidolin Canniatti Brazaca - ESALQ/USP, pelo apoio e amizade demonstrados na colaboração prestada.
- Ao Professor Dr. Jorge Mancini Filho, pelas análises de ácidos graxos.
- Às Bibliotecárias Beatriz Helena Giongo, Mílian Gustinelli, Eliana Maria G. Sabino e Kátia Maria A. Ferraz, pela revisão das referências bibliográficas e busca bibliográfica.

- Aos Técnicos de Laboratório Carlota B. Prudente dos Anjos, José Carlos Teixeira Mendes e Maria de Lourdes Perin Storer da ESALQ/USP, pela colaboração na execução do trabalho.
- Aos Professores e Funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP, pela ajuda, sugestões e cessão de uso de equipamentos.
- Aos colaboradores Hilcias Arruda Nicolau e Antônio Hugo Valério Júnior pela digitação e trabalhos de impressão e sugestões.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pela amizade e estímulos recebidos.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigada

SUMÁRIO

	pag.
RESUMO	iv
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	07
2.1. Situação atual da produção e industrialização do pescado	07
2.2. Resíduos de pescado	09
2.2.1. Tipos de resíduos	10
2.2.2. Aproveitamento de resíduos	14
2.3. Silagem de pescado	24
2.3.1. Definições	24
2.3.2. Produção e utilização da silagem	25
2.3.3. Processamento da silagem	29
2.3.4. Estocagem da silagem	33
2.3.5. Valor nutritivo	35
2.4. Silagem química de pescado	38
2.4.1. Uso dos ácidos	38
2.4.2. Monitoramento do processamento	41
2.5. Silagem enzimática do pescado	43
2.5.1. Aplicação das enzimas	43

pag.

2.5.2. Processamento do ensilado.....	45
2.5.3. Fases da autólise	48
3. MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Matéria prima	52
3.1.1. Preparação da massa homogênea	52
3.1.2. Enzimas	53
3.2. Métodos	53
3.2.1. Preparo da silagem química	53
3.2.2. Preparo da silagem enzimática	54
3.2.3. Avaliação visual	55
3.2.4. Coleta de amostras das silagens para análise	55
3.2.5. Análises químicas	56
3.2.5.1. Determinação do pH	56
3.2.5.2. Composição centesimal	56
3.2.5.3. Determinação de Nitrogênio Não Protéico	57
3.2.5.4. Nitrogênio Protéico	57
3.2.5.5. Digestibilidade "in vitro" ..	57
3.2.5.6. Análise de ácidos graxos	58

pag.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1. Fluxograma para produção de silagem de pe-	
cado	60
4.1.1. Etapas do preparo,.....	61
4.1.2. Avaliação sensorial das silagens	64
4.1.2.1. Silagem química	64
4.1.2.2. Silagem enzimática	65
4.2. Análises químicas	68
4.2.1. pH das silagens	68
4.2.1.1. Silagem química	68
4.2.1.2. Silagem enzimática	69
4.2.2. Composição centesimal das silagens ...	70
4.2.2.1. Composição da silagem quí-	
mica	72
4.2.2.2. Composição da silagem enzimá-	
tica	75
4.2.3. Composição em ácidos graxos das sila-	
gens	77
4.2.4. Fração nitrogenada das silagens	79
4.2.4.1. Silagem química	80
4.2.4.2. Silagem enzimática	82
5. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo elaborar silagem enzimática de pescado, como alternativa ao processo químico tradicional.

A utilização da silagem como fonte proteica para elaboração de rações, permite o aproveitamento dos resíduos da industrialização do pescado, normalmente problemáticos sob o ponto de vista de poluição ambiental.

Uma mistura de ácidos fórmico e propiônico (1:1) a 3% (v/p) foi empregada para preparação de silagem química, utilizando como matéria prima a sardinha, *Sardinella brasiliensis*, após descarte das vísceras e homogeneização da biomassa.

As silagens enzimáticas foram preparadas a partir da silagem química, adicionando-se às silagens químicas estabilizadas quanto ao pH, as enzimas comerciais; Pepsina de mucosa de estômago de suíno e a Protease, tipo II de *Aspergillus oryzae*, ambas da Sigma Chemicals - U.S.A..

Após a elaboração, as silagens foram estocadas por tempos definidos de 1 a 4 semanas, sendo monitoradas sensorial e quimicamente.

A hidrólise e a liquefação da silagem química foram aumentando continuamente até o final do experimento, não apresentando desenvolvimento aparente de fungos.

A composição de cada silagem a saber: umidade, proteína, lipídios e cinza foi relatada e as mudanças ocorridas na fração nitrogenada, como diminuição do Nitrogênio Total e o aumento do Nitrogênio não Protéico durante a estocagem.

Após 4 semanas, 36,28% do Nitrogênio Total estava sob a forma não Protéica na silagem química.

A digestibilidade "in vitro" da silagem química variou de 64,70% a 71,80%, com tendência a aumentar no decorrer da estocagem.

As silagens enzimáticas hidrolisaram mais rapidamente do que a silagem química, particularmente a silagem preparada com adição de protease fúngica.

Após 48 horas, 59,10% do Nitrogênio Total estavam sob a forma não Protéica na silagem enzimática com pepsina e 66,90% estavam sob essa forma na silagem enzimática com protease fúngica.

Para ambas as silagens enzimáticas empregando pepsina e protease fúngica, a digestibilidade "in vitro" foi alta após 48 horas quando comparada com a da silagem química, que apresentou valor semelhante após 4 semanas.

A digestibilidade "in vitro" da silagem enzimática com pepsina apresentou maior valor de 69,50% nas

primeiras 48 horas. A silagem produzida com a enzima protease fúngica apresentou o valor máximo de 71,70% ao final da primeira semana, portanto pode-se definir o final do processo no primeiro intervalo considerado no armazenamento.

É possível utilizar-se a silagem enzimática como alternativa ao processo químico, uma vez que a enzima acelera o processo e apresenta as características da hidrólise em menor tempo, o que proporciona utilização mais rápida do produto.

Recomenda-se a preparação de silagem enzimática com protease fúngica e armazenamento de uma semana.

SUMMARY

This work was carried out to obtain enzymatic silage of fish as an alternative for the usual chemical process.

The silage used as a protein source to produce animal feed and recycle the waste of fishery industry, usually a problem under the environmental pollution point of view.

A mixture of formic and propionic acids (1:1) at 3% (v/w) was added to *Sardinella brasiliensis* after removal of viscerae and meat homogeneization, for the chemical silage.

The enzymatic silages were prepared by adding Pepsin A (pig stomach mucosa) and Protease Type II of *Aspergillus oryzae*, both Sigma Chemicals - U.S.A. products, to the pH stabilized chemical silage.

After preparation, the silages were stored and chemically and sensorially monitored within a period from 1 to 4 weeks.

The hydrolysis and watering of the chemical silage grew continually until the end of the experience and mould development was not detected.

The composition of each silage such as moisture, protein, and lipids were reported and detected changes were detected on Nitrogen fraction as decrease of Total Nitrogen and increase of non Proteic Nitrogen during the storage periods.

After 4 weeks, 36.28% of Total Nitrogen was under Non Proteic Status in the chemical silage.

The chemical silage "in vitro" digestibility varied from 64.70% to 71.80%, with a increasing tendency during the storage period.

The enzymatic silage have hydrolyzed faster than the chemical silage, mainly the Protease silage.

After 48 hours, 59.10% of Total Nitrogen was as Non Proteic for pepsin silage and 66.90% for protease enzymatic silage.

Both enzymatic silages presented high "in vitro" digestibility after 48 hours; chemical silage showed almost the same level after 4 weeks. Pepsin silage "in vitro" digestibility was 69.50% after 48 hours. While the protease silage showed the maximum digestibility (71.70%) at the end of the first week, which determined the end of process to be at first period considered for storage.

After 48 hours, 59.10% of Total Nitrogen was Non Proteic Nitrogen for pepsin silage while for protease enzymatic silage 66.90% was found.

Considering that enzymes accelerate the process, it is possible to use enzymatic silages as an alternative for the chemical process due to the fact that hydrolysis happens in a shorter time than in the chemical silage, allowing the prompt use of the product compared to the usual chemical silage.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos das indústrias processadoras de pescado constituem sérios problemas de sanidade nas instalações e interferem nos custos e na eficiência de produção. A conversão de material residual em produtos comerciais permite a obtenção de novos produtos, a partir da recuperação da proteína e de outros nutrientes com o "flavour" de frutos do mar (HOOD & ZALL, 1979).

O aproveitamento das sobras comestíveis das operações de filetagem dos peixes de corte em postas, pode minimizar os problemas de poluição ambiental e abaixar os custo dos insumos e o custo unitário das matérias primas industriais. No caso do pescado, o material residual se constitui de aparas, carnes escuras, cabeças, carcaças e efluentes em geral.

Estima-se que na Noruega, 20 a 25 mil toneladas de resíduos do processamento do bacalhau são descartados anualmente. Na Indonésia, um mínimo de 225 mil toneladas de refugos de peixes são devolvidos ao mar e cerca de 200 mil toneladas de peixes por ano, não podem ser utilizados devido a deterioração ou injúrias; enquanto os resíduos do processamento somam 25 mil toneladas (KOMPIANG, 1981).

Nos Estados Unidos, os resíduos sólidos da indústria pesqueira chegam a 6 mil toneladas sendo aproveitados 50% na elaboração de rações para alimentação animal (REBECA et al., 1991).

A silagem de pescado é um produto líquido preservado pela ação de ácidos ou por fermentação microbiana podendo ser feito a partir do pescado inteiro ou de material residual deste. A liquefação é obtida pela atividade de enzimas proteolíticas naturalmente presentes nos peixes (KOMPIANG, 1981).

Todo esforço deve ser feito para aumentar o consumo humano de pescado, mas sempre haverá quantidade de peixes que são inadequados ou que estão em excesso à capacidade de processamento.

A silagem para alimentação animal não deve ser vista como um produto competidor com a farinha de pescado, por exemplo, mas pode se constituir na completa utilização das fontes disponíveis.

O pescado refugo está disperso por todas as regiões de pesca, porém a disponibilidade em algumas regiões é pequena para suportar uma planta de produção de silagem; há porém, nos países produtores, mais plantas artesanais do que modernas, que operam em apenas certos períodos do ano.

Pelo fato de nem sempre a farinha de pescado poder suprir a demanda, no caso de uso para ração, pois há casos de importação dela pelos países consumidores, bem como

devido ao crescente aumento de resíduos da industrialização do pescado, a silagem aparece como vantajosa proposta, inclusive a nível de pequenas unidades comerciais.

As vantagens da produção de silagem em relação à de farinha de 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 os problemas com odor são reduzidos; a produção é dependente do clima; a silagem pode ser produzida a bordo e o produto não ocupa armazenamento resfriado; o processo de ensilagem é rápido em climas tropicais e o produto pode ser utilizado de imediato. As desvantagens também devem ser consideradas: a silagem é um produto volumoso dificultando a estocagem e o transporte; muitos peixes tropicais tem alto teor de gordura que prejudica o processamento da silagem e o armazenamento do produto (KOMPIANG, 1981).

O gerenciamento de resíduos sólidos e também dos efluentes líquidos foi um dos tópicos discutidos com prioridade para o futuro do país em dois eventos ambientalistas realizados no Brasil, em junho de 1992; a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento "Rio-92" e a Feira e Seminário Internacionais de Tecnologia Ambiental (São Paulo). Uma comissão de energia e meio ambiente reuniu-se na sede da Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação - ABIA

logo após estes eventos e, dentre outros tópicos discutidos, constatou que a indústria de modo geral, está mais adiantada e apta a tratar os seus resíduos e efluentes do que os governos municipais (REUNIÃO da Comissão... , 1992).

O resíduo proveniente da industrialização de alimentos poderá ser aproveitado biotecnologicamente, por processos enzimáticos e ou microbiológicos. No entanto, a produção de novos alimentos ou nutrientes tendo como matéria prima o material residual, às vezes se torna inviável devido a escassez de material e elevado nível de investimento para implantação de uma unidade produtora.

As fermentações tradicionais como as de soja, arroz, melaço, soro de leite, leguminosas, frutas, etc, vem dando lugar a processos sofisticados com os avanços principalmente dos produtos lácteos fermentados. Porém, a biotecnologia de alimentos atinge níveis de sofisticação mais baixos do que os produtos da indústria farmacêutica, pois os alimentos são vendidos como mercadorias de pequena integração vertical entre produção e processo; nos medicamentos, os altos custos são justificados, mas nos alimentos, o produto melhorado é comprado desde que não haja acréscimo muito grande no preço.

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

eliminação de resíduos, matéria poluente e de difícil descarte.

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 utilização de produtos de maior digestibilidade, reduz a poluição ambiental que seria provocada pelo resíduo e diminui os gastos com alimentação. Muitas das sobras atualmente descartadas da indústria têm bom mercado, pois representam um rico material alimentício quando recuperado adequadamente, segundo normas higiênico-sanitárias (MORAIS & MARTINS, 1981; LISTON, 1977; TENUTA FILHO, 1983; SEAL, 1992).

SHOEMAKER (1986) afirma que todo resíduo proveniente da industrialização de alimentos será aproveitado no futuro, quer seja por processos que envolvam os microrganismos e digestão anaeróbica como a produção atual de "single cell protein", ou empreguem enzimas específicas, como as proteases, para evitar reações indesejáveis que estão associadas ao uso de catalisadores menos específicos.

Em países tropicais, grande quantidade de pescado, é perdida, especialmente em pesca de pequeno porte. É óbvio que metodologias que utilizem esses peixes são necessárias e urgentes para transformá-los preferencialmente em alimentação humana. Pesquisas tem sido conduzidas com esse objetivo, mas, enquanto o fato não se efetiva, o caminho mais

curto é transformá-los em alimentação animal. Em situações em que não é possível transformar resíduo de peixe em alimento à base de peixe para consumo humano, a silagem de pescado representa uma alternativa para a utilização desses resíduos (DISNEY et al., 1977).

No Brasil o aproveitamento dos resíduos do comércio de pescado é nulo, na indústria enlatadora aproveitam-se as sobras para preparo de farinha de peixes de baixa qualidade. Este resíduo é acumulado em tanques sem receber qualquer tratamento, fato que depõe contra a qualidade higiênica dessas plantas. Um manejo adequado do material descartado, com separação das partes comestíveis e estocagem em condições de acidez elevada possibilitaria à indústria brasileira a preparação da silagem, até mesmo para consumo humano.

Este trabalho teve como objetivos elaborar e caracterizar sensorial e quimicamente silagens enzimáticas preparadas a partir de resíduos da comercialização e da industrialização de pescado, particularmente da sardinha, como alternativa para o processo químico tradicional.

Dessa forma, espera-se contribuir com a indústria processadora de pescado no que se refere ao aumento da receita, conservação de energia e controle da poluição ambiental, além de tornar disponível uma nova opção para consumo de produtos do pescado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Situação atual da produção e industrialização do pescado

O total mundial de pescado capturado atualmente é de cerca de 90 milhões de toneladas, sendo 60% utilizados para o consumo humano e destes aproximadamente 30% na forma de refrigerados e congelados e 20% como salgados, defumados e enlatados.

Nos países desenvolvidos predomina a forma de consumo de pescado congelado, cerca de 50% do total. Nos países em desenvolvimento, onde a tecnologia empregada é menos sofisticada, produz-se pescado salgado seco e defumado. Estes países têm participado efetivamente da pesca mundial por estarem desenvolvendo sua infraestrutura de pesca, barcos, portos e centros de processamento. Nos últimos 20 anos, mais de 100 parques industriais filiaram-se aos 37 complexos transnacionais de 46 países em desenvolvimento, predominando a tecnologia japonesa. Dentre estes destacam-se Brasil, Peru, Tailândia, Burma, Marrocos, Kênia, Indonésia, Filipinas, Argentina e Uruguai (OETTERER, 1991).

O parque industrial brasileiro de pescado se desenvolveu ao longo do litoral, principalmente nas regiões sul e sudeste que absorvem cerca de 60% da produção. A indústria produz para consumo direto o pescado fresco resfriado, o pescado congelado inteiro, eviscerado, em filé e em postas; o pescado salgado, prensado, defumado e seco e o pescado enlatado; para consumo indireto, produz farinha e óleo.

O principal produto de exportação brasileira de pescado é o camarão congelado destinado, principalmente, aos Estados Unidos e ao Japão. Lagostas congeladas rendem altas divisas. O Brasil importa o pescado salgado seco, o bacalhau, principalmente da Noruega.

A produção brasileira de pescado no período 90/91 foi de 708.576 toneladas (ANUÁRIO Estatístico..., 1992). No entanto, considerando a extensa costa litorânea, os rios navegáveis, as represas das hidroelétricas e a região amazônica, que guarda 17% do total de água do mundo, além de mais de 2 mil espécies subexploradas, estima-se um potencial de 4 milhões de toneladas de pescado (OETTERER, 1991)

O pescado industrializado no Brasil teve seus primeiros incentivos na década de 60 e, em 1975, foi criado o Fundo de Investimento Setorial, Fiset/PESCA, com a finalidade de estimular, pelo financiamento, a produção.

Segundo a FAO, a produção brasileira em 1991 de pescado fresco congelado ou resfriado foi de 174.100

toneladas, de pescado salgado ou em salmoura e defumado, 22.100 toneladas, de conservas de pescado em geral, 52.700 toneladas e de crustáceos e moluscos congelados, 15.000 toneladas (FAO. Fishery..., 1993).

A situação do setor pesqueiro brasileiro está distante da ideal, pois a infraestrutura de distribuição comercial é inadequada com excesso de intermediários, há predominância da pesca artesanal, dificuldade de conter estoques reguladores na pesca industrial, riscos pela falta de campanhas que estimulem o consumo, má distribuição das unidades processadoras, baixa qualidade do pescado como matéria prima com prejuízo para o produto industrial, pouca diversidade dos produtos industriais e praticamente nenhuma utilização dos resíduos (ANDRADE, 1989; OETTERER, 1991).

2.2. Resíduos de Pescado

O termo resíduo refere-se a todos os subprodutos e sobras do processamento de alimentos e são de valor econômico relativamente baixo. 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).

2.2.1. Tipos de resíduos

No passado não havia a preocupação com a eficiência na utilização da proteína de descarte, e os resíduos não aproveitáveis se destinavam à fabricação de rações ou eram totalmente descartados. No caso de pescado, o material residual pode se constituir de aparas da "toilete" antes do enlatamento, carne escura, camarões fora do tamanho para descasque manual ou mecânico, cabeças, carcaças e efluentes em geral. Algumas pesquisas objetivaram o preparo da polpa de pescado com estes resíduos (LISTON, 1977; MORAIS & MARTINS, 1981).

Do total da captura mundial de pescado, cerca de 60% desta é utilizada nos mercados de pescado fresco, congelado, enlatado e salgado; os 40% restantes seguem para o preparo da ração animal. Os processos de comercialização e industrialização para consumo humano rendem de 25 a 75% da matéria prima como produto comestível. As partes não aproveitáveis somam 20 milhões de toneladas, o que mostra que mais de 2/3 da captura atual não estão sendo utilizadas como alimento humano (LAUBIER, 1979; HOOD & ZALL, 1979; REBECA et al., 1991).

Os resíduos de pescado, junto aos postos de beneficiamento e comercialização, causam sérios problemas de poluição ambiental, pois nem sempre é viável o transporte dos mesmos para as fábricas de processamento de farinha. Um método simples e de baixo custo para o aproveitamento desses resíduos é a silagem (NUNES, 1992).

Dos tipos de resíduos utilizados nos Estados Unidos, o mais comum, se constitui da descarga junto com a água (há um número significativo de água residual proveniente das várias etapas do processamento, e em muitos Estados já existem leis que exigem o tratamento). A principal dificuldade encontrada neste tratamento está nas características dos resíduos: grande volume, médio a alto DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) e sólidos em suspensão, além de altos níveis de gordura e proteína (JONES, 1974).

Um trabalho desenvolvido na Sumatra relata que os elasmobrânquios contribuem com a maior porção da pesca da costa marítima e que a maior desvantagem associada a eles é a presença de uréia que limita comercialmente sua utilização. Há em todo o mundo, muitas outras espécies de pescado que podem prover proteína de alta qualidade e que são subutilizadas (pequeno tamanho, carne escura, alto conteúdo de gordura, forte aroma, propriedades inaceitáveis de textura e outros fatores); mas que, podem ser usadas adequadamente como produtos resultantes de processos tecnológicos combinados (KARMAS & LAUBIER, 1987; SANKAR & SOLANKI, 1992).

MAHARAJ & RECKSIEK (1991) relatam que a costa marítima noroeste da América do Sul que se estende da Venezuela ao oeste do Rio Amazonas é uma zona altamente produtora de pescado. Mencionam que em 1984, a produção anual de camarões foi de 15 a 20.000 toneladas. Em contrapartida, dão uma estimativa de que uma média de 2.000 toneladas de produto de pesca foram descartados.

As vísceras de peixes, representam problemas para a indústria de pesca na Noruega. Estima-se que 20 a 25 mil toneladas de vísceras de pescado, que representam aproximadamente 50% do teor total de vísceras de bacalhau, "saithe" (*Pollachius virens*) e eglefim (*Gadus aeglefinus*), estão sendo descartadas nas fábricas (STROM et al., 1979).

Na Indonésia, estima-se um mínimo de 225 mil toneladas de refugos de peixes que são devolvidos ao mar e cerca de 200 mil toneladas de peixes que não podem ser utilizados devido à deterioração ou injúrias. Resíduos do processamento somam 25 mil toneladas. Estes grandes teores de resíduos disponíveis estão dispersos por todo o país e a disponibilidade em alguns lugares é pequena para suportar uma planta moderna que opere o ano todo (KOMPIANG, 1981).

No caso do bacalhau da Noruega, em uma produção de 450 mil toneladas, seguem 250 mil para consumo humano; os subprodutos somam 40 mil toneladas de vísceras e 160 mil de cabeças, aparas e ossos (ALMAS, 1989).

O aproveitamento das sobras de vôngoles como fonte de "minced", "chopped", "strips" e suco, além de ingredientes de "flavour" para preparo de sopas e "snacks", já vem sendo feitos em escala comercial. Resíduos de fabricação de farinhas de peixes podem ser submetidos à fermentação fúngica e transformados em ração isenta de resíduos tóxicos e de lipídeos oxidados (HOOD & ZALL, 1979; HOUSAIN et al., 1987).

As cabeças de camarão correspondem a cerca de 40 a 50% do seu peso total e apresentam problemas no congelamento industrial. Os resíduos podem ser recuperados para fabricar ração ou camarão solúvel que vem sendo usado para substituir 5% da fonte de proteína na dieta de camarões em cativeiro. O sabor e os componentes voláteis das cabeças de camarão são recuperados por digestão enzimática, concentração e "spray drying". O material solubilizado se constitui de 9 a 12% de aminoácidos e apresenta componentes sulfurados, cetonas, aldeídos, álcoois, ésteres, hidrocarbonetos, pirazinas, piridinas, amidas, amins e outros (TENUTA FILHO, 1983; PAN, 1989).

A fauna acompanhante da captura de camarão se constitui de uma mistura de espécies de diversas formas e tamanhos de baixo valor comercial; vem sendo estudada para fabricação de farinha e pode ser encaminhada para preparo de silagem (RODRIGUEZ et al., 1990a e b; OTTATI et al., 1990).

2.2.2. Aproveitamento de resíduos

Segundo GREENSHIELDS (1992), a idéia de reciclar resíduos, particularmente, de alimentos, não é nova, a exemplo da recuperação do vinho como vinagre. Entretanto os conceitos e motivos que dirigem as idéias para a utilização dos resíduos são vários, muitas vezes têm vida curta e frequentemente são tidos como desperdícios de investimentos.

Os aspectos científico e tecnológico são preteridos aos econômicos e políticos que têm mais força. Hoje, com o domínio da biotecnologia espera-se uma reversão de conceitos. Um levantamento feito em 1992, em pesquisa e desenvolvimento na área de tecnologia de alimentos na Inglaterra, revelou que as áreas da tecnologia de alimentos para a próxima década, de alto nível de prioridade são, entre outras, novos processos usando enzimas, recuperação de subprodutos e controle da poluição. O ideal será utilizar a matéria prima em toda a sua extensão, recuperar os subprodutos e assim evitar a própria obtenção do resíduo.

O aproveitamento das sobras comestíveis das operações tradicionais de filetagem ou de corte em postas de pescado assume importância muito grande, pois além de abaixar os custos dos insumos principais, minimiza os problemas de poluição e o custo unitário das matérias primas, quando comparado aos dos produtos acabados (LISTON, 1977; TENUTA FILHO, 1983; MORAIS & MARTINS, 1981; OETTERER et al., 1992).

No Brasil, segundo LAJOLO (1982), estuda-se como material residual da industrialização, bagaço de cana, palha de arroz, trigo, sabugo de milho, soro de leite, polpa, mucilagem e cascas de café e do cacau, melaço, resíduos da industrialização de frutas, vinhoto de cana e de mandioca, resíduos da fermentação de monoglutamato, entre outras. Neste trabalho, não há referência ao estudo dos resíduos da industrialização do pescado, há porém, a possibilidade de aproveitar estes resíduos como já ocorre com os vinhotos provenientes da fermentação de antibióticos, de monoglutamato, de cervejas e da obtenção de enzimas via bioconversão microbiana.

Para a UNITED NATIONS INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION - UNIDO (1991), a recuperação e a utilização de resíduos tanto sólidos quanto líquidos de pescado marinho, pode ser uma medida segura de proteção ao ambiente e à indústria. Assim, a UNIDO realizou em 1991, 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". A silagem, por exemplo, é sugerida como uma opção para operações em pequena escala. O resíduo pode ser adicionado de carboidratos como o melaço ou pode ser liquefeito pelo uso de ácidos orgânicos. A silagem pode ser produzida em partidas pequenas de 50 Kg ou em grandes tanques de 1 tonelada ou mais. Como boa fonte

protéica, a silagem de pescado pode substituir as farinhas de peixe e de soja na dieta de animais (UNITED Nations..., 1991).

Alguns pesquisadores têm estudado a possibilidade do emprego de sucos de frutas associados ou não a utilização de ácidos para o tratamento de resíduos de origem animal, incluindo o pescado. As propriedades bioquímicas e microbiológicas dos produtos foram consideradas adequadas por períodos de até seis meses em experimentos com suco de tamarindo associado ao ácido acético. A carne líquida de frango, de vaca ou de peixe pode ser produzida com a utilização de suco de abacaxi para fracionar a proteína (BACHANAN et al., 1992).

Para BIMBO & CROWTHER (1992), da produção de pescado e moluscos que é de cerca de 100 milhões de toneladas por ano, apenas 28% são processados como alimento e óleo. Os autores revelam que, pressões econômicas feitas em regiões pobres, baixos preços nas regiões tradicionalmente produtoras, e alto custo dos combustíveis forçaram a indústria a buscar novos mercados e produtos que possam tirar vantagem dos conteúdos protéico e de gordura do pescado.

GURGEL & FREITAS (1973), em trabalho onde avaliam o aproveitamento final do pescado dos açudes do nordeste brasileiro e analisam as perdas com o processamento e a possibilidade do aproveitamento dos resíduos para a elaboração de subprodutos, concluíram que os peixes de

pequeno tamanho como a sardinha, o "branquinho" e o "cangati", têm rendimentos baixos, de 62,1%, 59,6% e 68,7%, respectivamente.

Stamby (1963)¹, citado por GURGEL & FREITAS (1973), afirma que, na maioria das espécies de peixes, há um aproveitamento de cerca de 65%, depois de eliminadas a cabeça, as nadadeiras, as escamas e as vísceras. Desse estudo, destacam-se duas conclusões: a porcentagem dos desperdícios dos peixes de água doce do nordeste, em relação ao peso vivo variou de 20,5% a 53,4% e os desperdícios do pescado beneficiado, poderão ser aproveitados para a elaboração de subprodutos de fabricação doméstica, ou até mesmo industrial.

FREITAS & GURGEL (1976) publicaram trabalho sobre o aproveitamento de resíduos do pescado dos açudes do nordeste, na elaboração de subprodutos onde destacam que as vísceras do pescado capturado são totalmente desperdiçadas quando poderiam ser utilizadas na elaboração de subprodutos. Em 1975 estudaram 23 espécies de peixes de água doce, quando os autores observaram que, após beneficiadas, as vísceras constituíam cerca de 11% do peso total e que foi de 1.606 toneladas a quantidade deste material desperdiçado naquele ano, naquela região.

¹ STAMBY, M.E. *Industrial fishery technology*, Reinhold Publishing Corp., 1993. 393p.

A forma mais racional de se utilizar o potencial pesqueiro é recuperando mais as partes comestíveis dos peixes capturados, como as aparas após desossamento que podem se transformar em "minced fish"; 20 a 30% da captura acabam sendo descartados, nesta operação. Há busca de novos mercados para novos produtos como os concentrados protéicos, os isolados protéicos, as proteínas texturizadas, etc (HORISBERGER, 1979).

Conforme informações do Ministério da Indústria e Comércio brasileiro, em estudo de 1985, sob o aspecto de aproveitamento de resíduos, a indústria de pescado representa um potencial, pois seus descartes podem facilmente ser transformados em produtos com grande aproveitamento mercadológico, como a farinha. Os resíduos obtidos da produção brasileira de pescado enlatado, cerca de 50% do peso do peixe inteiro, poderão ser transformadas em farinha para consumo animal e óleo para produção de tintas, vernizes e acabamento de couros (BRASIL. Ministério..., 1985).

O processamento do pescado nos Estados Unidos rende o alimento em si, outros produtos como o óleo e os subprodutos. No caso da industrialização do "menhaden" ou savelha, *Brevoortia tyrannus*, o material remanescente do processamento é levado à cocção e prensagem para a extração do óleo. A água remanescente é separada dos resíduos sólidos e evaporada para a produção de um concentrado solúvel. O resíduo sólido é seco até atingir cerca de 10% de água e é

incorporado à farinha para ração. No caso do atum enlatado, as vísceras são removidas e usadas para preparo de rações e o fígado é usado como fonte de óleo e de vitaminas. A carne escura é separada e utilizada para ração. O mesmo ocorre no caso do salmão (*Oncorhynchus* sp.) e do atum (*Thunus* sp.) (JONES, 1994).

Algumas empresas americanas vêm aproveitando material residual liquefeito da industrialização do pescado para obter fertilizante em projetos combinados com a redução de pesticidas; apesar do custo ser maior do que os outros fertilizantes, acredita-se que com a divulgação, aumento de volume utilizado e desenvolvimento de novas técnicas de concentração, o custo será diminuído. A política é fazer com que todo empresário de pesca dê um destino ao material residual para que este seja uma nova fonte de renda (REGENSTEIN, 1990).

A biomassa marinha da Noruega vem sendo utilizada para produzir meios de cultura e produtos bioquímicos. Essa biomassa é antes de mais nada uma fonte de proteínas. No passado estas proteínas marinhas eram utilizadas diretamente como alimento humano, ou processadas como ração e óleo. Mas há um mercado mais refinado para estes produtos de diferentes aplicações, como por exemplo, a fabricação de meios de cultura que podem ser utilizados para fermentação. As peptonas marinhas tem dado bons resultados como meios para crescimento de microrganismos marinhos. As

enzimas digestivas que estão sendo produzidas a partir das vísceras de pescado são a pepsina, a tripsina e a quimiotripsina; a produção de hidrolisados protéicos de pescado é baseada na hidrólise promovida pelas enzimas do próprio tecido e das adicionadas (ALMAS, 1989).

A pesca recreativa no estado norte americano de Minnesota recolhe, anualmente, 13.608 toneladas de pescado e, pelo menos, metade desse número significa resíduos. Trabalho utilizando compostagem desses resíduos, e subsequente avaliação estatística dos custos, mostrou resultados promissores (SMALL-scale..., 1992).

De acordo com um programa desenvolvido em 1990 pelo estado de Michigan, E.U.A., que tinha como objetivo livrar áreas de pesca para esporte e de pesca para transformação industrial, das carcaças e resíduos indesejáveis ali deixados, adotou-se a silagem que se mostrou plenamente satisfatória. Foram oferecidas aos usuários remunerações pelos resíduos e a planta foi instalada. Após 6 a 8 semanas do início da silagem as carcaças tinham sido desfeitas e o odor era agradável (COMPOSTING fish..., 1991).

Em 1990, durante "Workshop" promovido pelo IFT - Institute of Food Technologists sobre resíduos de pescado, relatou-se que na Europa muitos pesquisadores têm feito silagem para cultura de peixes, e, em particular na Alemanha, estudou-se a compostagem em termos de redução de volume

(50-75%) a redução de DBO (90%), além da eliminação de odores e controle de patogênicos (INSTITUTE of Food..., 1992).

Dentro da mesma linha uma pesquisa canadense sobre compostagem de resíduos de alimentos é muito otimista quanto às aplicações futuras. Relata que as comunidades locais tiveram interesse em cooperar e que o produto final teve um custo baixo. O autor traçou um paralelo com os modelos europeus de compostagem de resíduos orgânicos (SPENCER, 1990).

Para FREDERICK (1992 a e b), o processamento comercial de pescado perfaz mais de 1.400 toneladas de resíduos anualmente no estado de Wisconsin, Estados Unidos, com o agravante de que a pesca, provavelmente, produz quantidade equivalente. Baseado nesses dados, o autor coordenou um projeto para avaliar a viabilidade econômica da compostagem de resíduos de pescado com pó de serra. O material só ficou pronto para o teste de mercado dois anos após (a madeira sob as condições utilizadas precisou desse tempo para se decompor) e a avaliação final do autor foi de que, em pequena escala, a compostagem como negócio é atrativa, mas lucrativamente desvantajosa em escala industrial em função do custo do transporte dos grandes volumes utilizados a grandes distâncias. Assim, o autor recomenda que a planta de produção esteja próxima à área de consumo.

Ainda, o mesmo autor resume os trabalhos realizados e discutidos na "National Fisheries By-products Composting Conference" em outubro de 1991, no estado americano de Wisconsin. Assim, sabe-se que na Flórida um trabalho realizado com carcaças e resíduos da lagosta azul, conseguiu reduzir em 17% o volume do descarte; a Universidade de Minnesota - Duleith estima que até o final do ano, cerca de cem unidades para compostagem de resíduos de pescado devem ser construídas; um processo simplificado de tecnologia vem sendo desenvolvido para processar lagostas; a Universidade de Columbia tem desenvolvido plantas e assegurado recursos para construção de locais para compostagem piloto; a Universidade de Washington tem produzido quatro tipos de compostos com resíduos de pescado e camarão variando o material adicionado.

DISNEY et al. (1977), em trabalho que pretendeu traçar um panorama mundial do desenvolvimento de silagens destacou que houve um renovado interesse em silagem de pescado utilizando resíduos. Nesse trabalho, o autor discutiu ainda, a possibilidade de utilização de outros resíduos não convencionais e deu particular ênfase à pequena escala de pesca e conservação de valiosos suplementos protéicos.

A importância do aproveitamento de resíduos da industrialização do pescado, bem como o atual estado da arte deste assunto, podem ser vistos nas recomendações do "43rd Annual Meeting Pacific Fisheries Technologists", realizado em 1992 na Califórnia, Estados Unidos, onde foram discutidos os

trabalhos em andamento nesta área. Assim, N. Henderson (Rutgers University - New Jersey) demonstrou as tendências da utilização de resíduos na indústria de processamento de mexilhões no Estado de New Jersey, S. Andree (Florida Sea Grant) dissertou sobre o preparo de compostagem na região de Big Bend do Estado da Florida utilizando vísceras de mexilhões e caranguejos, J. Cato (Florida Sea Grant) sumarizou as técnicas de preparo de composto utilizando resíduos sólidos do processamento de pescado marinho, T. D. Harrison (Virginia Tech) caracterizou os resíduos sólidos e líquidos nas fábricas de processamento de caranguejos e discutiu a habilidade das indústrias para atingir o aproveitamento integral dos efluentes, D.P. Green e S. Hudson (North Caroline State University) explicaram a metodologia de aplicação das técnicas de prevenção da poluição para redução de resíduos e discutiram o desenvolvimento de filmes e fibras a partir da quitina e seus derivados (INSTITUTE OF Food..., 1992).

No Brasil alguns trabalhos sobre o aproveitamento de resíduos de pescado, em experimentos de laboratório, foram apresentados no XIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, assim, NUNES, 1992, (UFPB - Paraíba) preparou silagem com utilização de ácido acético; VIEIRA et al., 1992 (UFC- Ceará) fez a avaliação biológica do hidrolisado preparado com subprodutos da lagosta, visando obter peptona; SALES et al., 1992 (DEPAN/FEA

- São Paulo) apresentou alguns indicadores de qualidade protéica e dietética, bem como os efeitos da complementação protéica da dieta comercial com silagem de tilápia e OETTERER et al., 1992 (ESALQ/USP - São Paulo) apresentaram experimentos sobre a possibilidade de produção de silagem ácida, enzimática e microbiológica com resíduos do processamento do pescado de água doce.

2.3. Silagem de pescado

2.3.1. Definições

A silagem é um produto líquido preparado com pescado inteiro ou picado, ou parte dele, ao qual tenham sido adicionados ácidos e a liquefação da massa tenha ocorrido, inclusive pela ação das enzimas já presentes no pescado. O produto líquido, pode ser obtido por outras vias, porém o princípio é o de que as enzimas presentes após a moagem da massa, são difundidas uniformemente e sua ação é favorecida pelo agente de acidez através do uso de ácidos; estes também inibindo a ação microbiana. A silagem é tradicionalmente usada como alimentação animal e pode ou não conter gorduras (TATTERSON & WINDSOR, 1974).

A silagem de pescado se constitui em um produto líquido preservado pela ação de ácidos (silagem química) ou por fermentação microbiana induzida por carboidratos (silagem

biológica) e pode ser feita a partir do pescado inteiro ou do material residual do pescado. A liquefação é conduzida pela atividade de enzimas proteolíticas naturalmente presentes nos peixes e, ou adicionadas (silagem enzimática) (KOMPIANG, 1981).

HAARD et al. (1985), em trabalho que trata da estabilização da proteína e do óleo em silagem de pescado para a suplementação alimentar de ruminantes, definem silagem como sendo o produto liquefeito obtido de resíduos de pescado que são cortados e misturados com ácido, as enzimas presentes quebram a proteína e a liquefazem, enquanto a acidez previne a deterioração microbiana.

O princípio envolvido na manufatura de silagem é o de que as enzimas já presentes são incorporadas à massa através da moagem; o ajuste do pH favorece a rápida ação dessas enzimas inibindo a ação das bactérias. Produtos liquefeitos de pescado podem ser obtidos de outras maneiras, por exemplo, pela adição de enzimas ou pela adição de bactérias produtoras de ácido láctico (TATTERSON & WINDSOR, 1974).

2.3.2. Produção e utilização da silagem

GREENSHIELDS (1992) traça um panorama dos processos tecnológicos para a produção de alimentos e utiliza o conceito de biotecnologia como um marco divisório entre os

"antigos conceitos" e os "novos conceitos" que lançam mão da bioengenharia das enzimas e dos microrganismos, levando à ausência ou diminuição da poluição ambiental. O autor acredita ser possível a obtenção de produtos com resíduos animais reciclados pela adição de outros componentes utilizando o sistema da natureza.

Sabe-se que no passado não houve grande preocupação com a eficiência na utilização de proteína residual, aceitando-se grandes perdas, na forma de resíduos ainda aproveitáveis, como resultado final de uma dada operação no processamento de pescado. Tais resíduos tem sido, então, destinados à fabricação de rações animais ou descartados (HORISBERGER, 1979).

Para TATTERSON & WINDSOR (s/d), a idéia de silagem não é nova; o primeiro trabalho foi feito na Suécia em 1930, e a Dinamarca iniciou a primeira produção comercial dez anos depois.

A silagem de pescado é produzida na Dinamarca, Noruega, Polônia e países da Europa (HAARD et al., 1985).

Em escala comercial a silagem vem sendo produzida na Polônia e na Dinamarca desde os anos 60, para a produção de alimentos para aves e suínos ou incorporada a rações como complemento protéico, compondo alimentos para animais domésticos e peixes provenientes da aquacultura. Na França está se produzindo um hidrolisado protéico de pescado com 90% de proteína, desossado e que alcança US\$ 1,500 por

tonelada. Na Indonésia, a silagem é produzida em escala experimental e utilizada em rações que substituem a farinha de peixe e a de soja em alimentação de suínos, peixes e aves. Apesar de comum nos países escandinavos, onde são utilizadas há muitos anos com sucesso, a produção industrial da silagem é limitada devido ao alto teor de umidade, o que torna difícil o transporte do produto a longas distâncias. Pode-se obter produtos na forma de pasta como na Austrália aproveitando as vísceras de abalone ensiladas com cereais em grão. O sabor e a aceitabilidade de carnes de frangos alimentados com silagem foram considerados adequados pelos consumidores (KOMPIANG, 1981).

A silagem é usada na alimentação animal da mesma forma que outros alimentos na forma líquida ou desidratada. É indicada em criação de suínos, que utiliza sistema líquido de alimentação em função da qualidade e do "flavour". Outros animais como vacas leiteiras e galinhas têm se alimentado com bons resultados (TATTERSON & WINDSOR, s/d).

A adição de silagem de pescado à ração foi considerada uma maneira efetiva de enriquecer as rações de suínos, uma vez que grande quantidade de proteína bruta é absorvida, sendo portanto, a silagem de pescado comparável à silagem vegetal (HAARD et al., 1985).

A silagem líquida de pescado é fonte de proteína de alta qualidade e de minerais para a alimentação animal; é versátil, e pode ser utilizada como suplemento da

ração de vários animais como peixe, suíno, ovelha, gado e aves domésticas (HAARD et al., 1985).

A silagem de pescado é consumida em maior escala como alimento para animais, aves e suínos, unicamente, ou incorporada a rações como suplemento. Cada 100Kg de matéria seca de silagem tem 19,41Kg de proteína crua digestível e 53,79Kg de nitrogênio digestível; contém vitaminas B1, B2, B12, ácido pantotênico e ácido nicotínico (ANDRADE, 1983).

Embora uma considerável quantidade de silagem líquida seja produzida na Europa, principalmente para a alimentação animal, nenhuma, por enquanto, é produzida nos trópicos. Mencionam-se alguns experimentos que estão sendo conduzidos, mas, mais informações são necessárias a respeito de experimentos de países em desenvolvimento (DISNEY et al., 1977).

RODRIGUES et al. (1990b) ensilaram espécies que acompanham a captura do camarão na Venezuela, utilizando uma mistura de ácido sulfúrico diluído e ácido fórmico concentrado na proporção de 1:4 por 17 dias. O produto foi analisado biologicamente em ratos e o resultado para a proteína foi similar ao grupo controle (caseína). O trabalho recomenda a utilização do ensilado como substituto da farinha de pescado e como fonte de proteína na alimentação de frangos de engorda em idade de crescimento.

A produção de silagem é desaconselhável em áreas onde, descartes de peixes são obtidos com regularidade variável, ou em pequenas quantidades. Pode, no entanto, ser fabricada na planta de processamento, se o produto puder ser aproveitado regionalmente (KOMPIANG, 1981).

DISNEY et al. (1977) citam outros autores para respaldar a opinião deles de que, para facilitar e baratear o custo da estocagem da silagem, deve ser feita uma secagem do produto. Sob as nossas condições, esta operação seria inviável comercialmente uma vez que a prática de utilização regular do produto como alimentação animal ainda é incipiente. A expectativa, é a de produzir no campo, uma silagem seca ao sol que seja adequada a um maior número de sistemas comerciais de produção animal, já que fontes de carboidratos podem ser incorporadas à silagem e depois desidratadas. Nessas condições a produção de silagem de pescado pode ser viável.

Flutuações sazonais ou diárias e a utilização de somente uma pequena quantidade de resíduos de pescado, fazem com que a produção comercial de alimentos produzidos com pescado, não se torne atrativa (DISNEY et al., 1977).

2.3.3. Processamento da silagem

O mecanismo que determina a liquefação da silagem está no papel das enzimas das vísceras que se

difundem pela massa cárnea e são responsáveis pela hidrólise; porém peixes eviscerados também liquefazem, pela presença de enzimas dos tecidos (TATTERSON & WINDSOR, 1974; KOMPIANG, 1981; STROM & EGGUM, 1981; ANDRADE, 1983; ANDRADE, 1984; RODRIGUEZ et al., 1990a e b).

A taxa de liquefação depende do tipo de matéria prima, se fresca, e da temperatura do processo. Os peixes frescos e os peixes gordurosos liquefazem mais rapidamente. É importante que nas instalações haja condições para adição do ácido imediatamente após o material chegar à indústria; assim evita-se a liquefação lenta. Aquecer a mistura acelera o processo; a silagem se mantida a 20°C leva em média 2 dias para liquefazer, se a 10°C, 10 dias. Assim no inverno recomenda-se aquecer a mistura inicialmente (TATTERSON & WINDSOR, s.d.; STROM & EGGUM, 1981).

Durante o processo de ensilagem, as proteínas são hidrolisadas pelas enzimas e o nitrogênio se torna mais solúvel. A proteólise na pele e vísceras é maior durante as primeiras 24 horas. O teor de nitrogênio solúvel aumenta de 10 a 20% nos primeiros dias de estocagem a 23°C. Após 10 dias, o aumento é de 75% e após 1 mês, de 85%. Após 3 dias de silagem, 50% do total de nitrogênio está sob a forma não protéica e o teor de aminoácidos livres aumenta rapidamente durante os cinco primeiros dias (BACHOFF, 1976; WINDSOR, 1979; STONE & HARDY, 1986).

A silagem se liquefaz e uma separação mecânica pode isolar uma camada de lipídeos, uma camada proteica aquosa e um sedimento insolúvel. Estas fases podem ser separadas por centrifugação. Às vezes é conveniente promover uma peneiragem para aliviar o trabalho da centrífuga. Após cerca de 2 semanas, 85% da proteína da silagem está em solução. A fenilalanina e particularmente a tirosina, são levemente solúveis em solução aquosa. Em estocagem longa estes aminoácidos precipitam devido ao fato de terem sido liberados na hidrólise protéica. Os teores de metionina e de lisina são altos após uma semana. Um aumento do NPU (Net Protein Utilization) se deve ao aumento do nível da lisina (WINDSOR, 1979).

Se as espécies utilizadas contém alto teor de lipídeos, o óleo deve ser removido; esta operação é onerosa devido aos solventes. Após a autólise, a maioria dos lipídeos, pode ser removida por centrifugação, ou após aquecimento a 95°C e centrifugação (WINDSOR, 1979).

Geralmente, na prática, os lipídeos não são separados. No caso do bacalhau da Noruega, o teor de lipídeos das vísceras destinadas à silagem varia, dependendo da remoção manual do fígado, que é utilizado para produção de vitamina A. Ao se objetivar obter um produto de diferentes matérias primas, porém uniforme, convém pensar em um método rápido para remoção dos lipídeos. Um teor aceitável de

lipídeos na silagem processada é de 0,5% para produtos comerciais (TATTERSON & WINDSOR, 1974).

Acredita-se que o grau de hidrólise pode ser usado como um critério químico para avaliar a silagem de pescado. A hidrólise das proteínas em pequenos peptídeos e aminoácidos livres, torna-as mais utilizadas para a biossíntese, do que as proteínas intactas (ESPE & NJAA, 1989).

Embora a liquefação da silagem se complete em 2 ou 3 dias, a proteína da silagem de pescado é continuamente hidrolisada por pelo menos um mes (HAARD et al., 1985).

Tão importante quanto conhecer a composição da silagem, é conhecer as mudanças químicas que ocorrem durante o armazenamento. Para DISNEY et al. (1977), a liquefação é entendida como uma autólise, mais predominantemente, a proteólise, cujos resultados aparecem muito rapidamente, cerca de uma semana, quando 70% do nitrogênio presente se torna solúvel. O mesmo autor mostra que tais alterações são dependentes da temperatura e favorecidas a 30°C.

A silagem pode ser produzida com pescado semi gordo ou gordo. Nesse caso, é necessário remover a gordura em algum estágio da produção, uma vez que estas se deterioram rápido e um alto grau de oxidação produz perda de valor nutricional (TATTERSON & WINDSOR, s.d.).

2.3.4. Estocagem da silagem

A silagem de pescado mantida sob correta acidez, permanecerá à temperatura ambiente por pelo menos dois anos sem deterioração. A silagem comercial deve ficar estocada pelo menos 6 meses pois poderá desenvolver melhor consistência e apresentar aroma agradável (TATTERSON & WINDSOR, s.d.).

Sob estocagem, na silagem de peixe, há um aumento de amônia e de ácidos graxos livres, porém pequeno. A estabilidade da silagem dependerá da manutenção do pH abaixo de 4,5, conforme o ácido utilizado. A preservação se mantém por mais de um ano e o aroma desprendido é ácido. O índice de acidez em ácidos graxos na silagem oscila entre 50 e 60 o que corresponde a cerca de 20% de ácidos graxos livres. Quanto aos aminoácidos após longa estocagem há diminuição do triptofano o que diminui o valor biológico da silagem, porém o teor de lisina permanece (BACKHOFF, 1976; GILBERT & RAA, 1977; STROM et al., 1979).

A viscosidade da silagem é função do conteúdo de vísceras e do conteúdo de óleo, mais do que da solubilidade da proteína. Os oligopeptídeos aumentam com rápido declínio da viscosidade (HAARD et al., 1985).

DISNEY et al. (1977), resumem as mudanças que ocorrem com os lipídeos durante o armazenamento da silagem. Mencionam, que o aumento do conteúdo de ácidos graxos livres,

indica hidrólise de glicerídeos, enquanto mudanças oxidativas causam escurecimento; um teor de até 3% de ácidos graxos livres é desejável. Os autores recomendam que para manter a qualidade do produto deve haver uma rápida remoção da gordura pois as maiores transformações ocorrem no início do processo e são dependentes da temperatura.

No entanto, além de 90 dias de estocagem da silagem, esta perde parte do seu valor nutricional devido a hidrólise de proteínas a pequenos peptídeos e aminoácidos livres; também a saponificação pode contribuir para a diminuição da qualidade. A adição de formaldeído após a liquefação se completar serve para prevenir a hidrólise contínua e a rancificação. Este componente também diminui o desenvolvimento de odores estranhos e a formação de bases voláteis. Este procedimento é recomendado para uso da silagem de pescado em mistura com forragem, na alimentação de ruminantes. Outros aditivos são recomendados no preparo da silagem como o sorbato de potássio, para evitar o desenvolvimento de fungos. Quando a silagem é preparada sem a adição do sorbato de potássio, pode aparecer na superfície um visível crescimento de fungos e leveduras (HAARD et al., 1985; ESPE et al., 1989; LEVIN & WITKOWSKI, 1991).

KOMPIANG (1981) quando discute a avaliação nutricional, menciona que a silagem supre aos animais de teste a porção protéica, similarmente, à dieta controle. Destaca que a eficiência de conversão se torna baixa e o

valor nutricional é também afetado negativamente com o aumento do tempo de estocagem. Para ele, há uma relação direta do escurecimento provocado por reações dos lipídeos com a perda do valor nutricional.

2.3.5. Valor nutritivo

A composição da silagem de pescado é muito semelhante a do material que lhe deu origem. A composição do material residual, por exemplo, de pescada branca (*Urothycis tenuis*) é de cerca de 80% de umidade, 15% de proteína, 4,5% de cinza e 0,5% de lipídeos. A silagem de pescado ao ser usada como ração da mesma forma que a farinha de pescado, será fonte de 15% de proteína, quando a farinha tem cerca de 65%. Portanto, a melhor utilização da silagem é para a alimentação de suínos, uma vez que pode ser utilizada na forma líquida (KOMPIANG, 1981).

A composição final da silagem varia consideravelmente com o tipo de matéria prima empregada (HAARD et al., 1985).

DISNEY et al. (1977), ao avaliarem a composição aproximada da silagem de pescado, relatam que esta é a mesma da matéria prima, apesar da pequena diluição provocada pela adição do ácido, e que se altera com a retirada do óleo, aumentando os componentes na proporção do óleo removido.

Apesar das alterações previstas nas estruturas físicas e químicas do peixe, o valor nutricional da silagem é semelhante ao da matéria prima, podendo ser estocada comercialmente por 6 meses (TATTERSON & WINDSOR, s.d.).

O valor nutricional da silagem está na digestibilidade protéica elevada e na presença de lisina e triptofano entre outros aminoácidos essenciais (OETTERER, 1992).

O valor nutricional da silagem, que está na digestibilidade desta, deve ser preservado evitando-se estocagem prolongada do produto. O grau de hidrólise deve ser utilizado como um critério químico da qualidade para a silagem, pois ao haver a autólise e em seguida a rancificação, o produto fica prejudicado. Análises de sabor e aceitabilidade da carne de frangos alimentados com silagem incorporada à ração mostraram a viabilidade do produto (ESPE & NJAA, 1989; RAA & NJAA, 1989).

STROM & EGGUM (1981) avaliaram nutricionalmente, através de ensaio biológico, silagem de pescado preparada com vísceras e uma mistura de ácidos fórmico e propiônico [1:1(p/v.)] a uma concentração final de 1,5% (p/v.) e concluíram que o valor nutricional da silagem aumentou após estocagem e remoção de lipídeos, produzindo um aumento da utilização da proteína bruta (NPU) de 60 a 70%. Os autores consideraram que o aumento do NPU pode ser atribuído principalmente ao aumento do nível de lisina e que no

experimento a histidina não foi identificada como um fator limitante.

Tal idéia é rebatida por STONE & HARDY (1986), que afirmam que a silagem "fresca" é nutricionalmente superior a silagem estocada e mantida a pH 2,0, uma vez que os peptídeos são melhor absorvidos que os aminoácidos livres, a amônia e os produtos de degradação acumulados no decorrer do período de autólise.

Para ESPE et al. (1989), o valor nutricional da silagem não estocada foi melhor, em experimentos com ratos, que a estocada. A digestibilidade e a utilização da proteína são maiores na silagem fresca do que na silagem estocada (com mais de 90 dias a proteína é pouco utilizada pelos ratos) como consequência da autólise e rancificação da silagem.

TATTERSON & WINDSOR (1974), quando discutem sobre alguns aspectos nutricionais da silagem estocada, dizem que estudos das modificações do nitrogênio solúvel, indicam que ocorre uma rápida quebra nas proteínas para peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres. Após 30 dias de estocagem, cerca de 75 a 85% do total do conteúdo de nitrogênio, se torna solubilizado. Os autores ressaltam que o óleo contido na silagem após estocagem tem um alto teor de ácidos graxos livres.

BACKHOFF (1976) monitorou as transformações químicas ocorridas em silagem de bacalhau preparadas com vísceras, pele e outras partes, durante a estocagem,

verificou a formação de nitrogênio não protéico (aminoácidos livres, bases voláteis e polipeptídeos) e destacou perda de triptofano com manutenção do teor de lisina.

2.4. Silagem química de pescado

A silagem ácida de resíduos de pescado foi desenvolvida originalmente a partir de um método patenteado por A.I. Virtanen em 1920, que utilizava ácidos sulfúrico e hidrocloreídrico e o produto era neutralizado com carbonato de cálcio (DISNEY et al., 1977).

2.4.1. Uso dos ácidos

O uso de ácido fórmico para preservação de material residual destinado às rações se iniciou após a Segunda Guerra Mundial.

Segundo DISNEY et al. (1977), na preparação de silagem ácida a escolha do agente de preservação deve recair entre um ácido mineral, mistura de ácidos minerais, ácidos orgânicos como o fórmico e o propiônico ou mistura de ácidos inorgânicos e orgânicos. O autor complementa dizendo que a utilização vai depender do custo e da avaliação do ácido e das condições em que o produto será preparado. O ácido fórmico é mais caro que os ácidos minerais comuns, mas produz

silagens que são menos ácidas e não requerem neutralização antes do uso.

KOMPIANG (1981), da mesma forma, considera que na preparação da silagem química, a escolha do agente preservativo deve recair entre o ácido mineral, a mistura de ácidos minerais, os ácidos orgânicos ou uma mistura de ácidos minerais e orgânicos. A mistura dos ácidos fórmico e propiônico tem sido recomendada. Têm sido demonstrado também que os constituintes da carcaça do peixe são um fator importante na escolha do ácido e sua quantidade (KOMPIANG, 1981).

Ácidos orgânicos, como o ácido fórmico são geralmente mais onerosas que ácidos minerais, mas produzem silagens que não são muito ácidas (pH 4,0 a 4,5) e que não exigem neutralização antes do uso. Acidez muito forte (pH 2,0) é necessária quando ácidos minerais são usados. Tal fato mostra que a preservação não depende somente da acidez e que se o ácido tem uma forte ação bactericida, misturas com pH mais alto são aceitáveis (KOMPIANG, 1981).

Em trabalho desenvolvido na Inglaterra, por DISNEY et al. (1977), a escolha recaiu no ácido fórmico a 85% que previne bactérias, fungos e patogênicos como *Salmonella* e *Clostridium botulinum* a um pH de 4,0.

KOMPIANG (1981) obteve silagem ácida com leve odor ácido utilizando 3% (v/p) da mistura de ácido fórmico e propiônico (1:1).

Em trabalho realizado com sardinhas do Mediterrâneo (*Sardina pilchardus*), citado por TATTERSON & WINDSOR (1974), indicou-se que a solução mais aceitável e de menor custo para a utilização de ácidos na preservação do material era a mistura de 6:1 ácido sulfúrico/ácido fórmico.

Uma mistura de ácidos fórmico e propiônico tem sido recomendada, pois no caso de se utilizar a proporção 1:1; fórmico:propiônico e adição de 3% volume/peso à biomassa, a silagem que se obtém é estável com aroma acidificado. Os ácidos minerais como o ácido hidrocloreídrico e o ácido sulfúrico podem ser utilizados, pois são de baixo custo, porém tem a desvantagem de necessitar uma neutralização antes do consumo. Segundo Hasson & Lovern², citados por TATTERSON & WINDSOR (1974), o uso de ácido fórmico é menos corrosivo que ácidos minerais fortes e tem um excelente efeito bacteriostático.

TATTERSON & WINDSOR (s.d.) indicam como adequada, a utilização de ácido fórmico, a uma concentração de 85% e na proporção de 3,5% do peso total da biomassa.

A mistura de ácidos é mais recomendada do que a escolha de um único, devido ao fato de que alguns ácidos, como o ácido fórmico, permitem o crescimento de fungos, principalmente em silagens onde se utiliza fontes de carboidratos, além do pescado. O ácido propiônico inibe o

² HASSON, M.F. & LOVERN, J.A. *Fishing News*, 11, 1988.

crescimento de fungos a concentrações de 0,2% e a pH até 5,5,; estes valores demonstram a clara atividade fúngica do ácido propiônico e as vantagens do uso deste ácido orgânico no preparo de silagem. Em caso de silagem onde se adiciona fontes de carboidratos pela adição de glicose, o crescimento de *Aspergillus flavus* pode produzir aflatoxinas representando uma redução da aplicação a peixes especialmente em áreas tropicais (KOMPIANG, 1981).

Experimentos de laboratório indicam que a utilização de ácido mineral e ácido fórmico (que combinam baixo pH e ação bacteriostática), produz o tratamento ácido mais econômico (DISNEY et al., 1977).

2.4.2. Monitoramento do processamento

JAMES et al. (1977) procederam um estudo comparativo de silagens preparadas por via fermentativa e por adição de ácido fórmico. Os resultados mostraram que a composição das silagens foi similar, embora a quantidade de aminoácidos livres tenha sido ligeiramente menor nos produtos fermentados. A hidrólise da proteína foi maior na digestão pelo ácido fórmico, comparada à produzida pelo ácido láctico proveniente da fermentação. Ambas as silagens, apresentaram ausência de organismos patogênicos e não exigiram neutralização antes de serem oferecidas aos animais.

GILBERT & RAA (1977) estudaram as propriedades do ácido propiônico e ácido fórmico, na preservação da silagem de vísceras de bacalhau (*Gadus morhua*), na proporção de 0,75 (v/p) utilizando os ácidos na mesma proporção (1:1). Concluíram que as silagens produzidas formam produtos estéreis a pH 4,3, por meses, à temperatura ambiente em tanques abertos ou fechados. Consideraram que embora a silagem com ácidos fórmico e propiônico seja estéril, a quantidade de amônia aumenta, provavelmente por reações de desaminação catalizadas pelas enzimas endógenas do material utilizado.

SALES et al. (1992) elaboraram uma silagem de tilápia, *Sarotherodon niloticus*, com a adição de ácido fórmico a 3% (v/p) e acompanharam o processo de autólise à temperatura ambiente. Monitoraram pH, nitrogênio não protéico, nitrogênio α -amínico durante 90 dias e a viscosidade durante os primeiros 30 dias, cabendo destacar os seguintes resultados: nitrogênio não protéico/nitrogênio total = 55-60 nos primeiros 55 dias; a medida da viscosidade diminuiu uma unidade de centipoise comparando-se o primeiro com o trigésimo dia; os valores de pH, foram ligeiramente superiores no início da autólise, com valor inicial de 4,10, mostrando-se praticamente inalterado até 90 dias, quando atingiu 3,82; a composição centesimal do autolisado foi: umidade 74,64%; proteína bruta 14,90; lipídeos totais 4,72% e cinza 3,74%.

NUNES (1992) substituiu o ácido fórmico comumente utilizado no preparo da silagem por ácido acético, que segundo a autora, apresenta menor preço e maior disponibilidade, utilizando a proporção de 4:1 (v/p). A silagem produzida apresentou parâmetros similares aos encontrados por outros autores com silagem produzida com ácido fórmico. De acordo com a pesquisadora, esta silagem pode ser recomendada para as alimentação de suínos, aves e peixes.

2.5. Silagem enzimática do pescado

2.5.1. Aplicação das enzimas

Os tratamentos dos resíduos de alimentos com enzimas ganharam força devido às técnicas atuais de DNA recombinante que trouxeram um impacto no custo e utilização das enzimas. As enzimas oferecem alta seletividade; os processos que as envolvem são eficientes e controláveis, são específicas e evitam o aparecimento de reações indesejáveis; exercem seu efeito a relativamente baixas temperaturas e podem ser utilizadas a baixas concentrações com fácil remoção do sistema de reações ou nem mesmo remoção (OETTERER et al., 1992).

O uso de enzimas no processamento de alimentos de origem marinha tem se tornado uma importante pesquisa em

expansão em países com tradição pesqueira. A descoberta de novas enzimas extraídas de organismos marinhos para uso em escala industrial está também em alta (WRAY, 1988).

As enzimas mais utilizadas no processamento de resíduos aquáticos são as proteases. Pesquisa-se também o uso das enzimas de pescado, dos músculos e das vísceras, que são a pepsina e a catepsina que têm atividades ótimas a pH 3,7. Estas enzimas podem ser extraídas após moagem e emprego de solução extrativa a base de água, ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Esta técnica é empregada para obtenção de isolados protéicos (MEINKE & MATTIL, 1973).

ROLLER & SWINTON (1990) relatam que, em termos de quantidades usadas a indústria de processamento de alimentos é a maior consumidora de enzimas industrializadas e que muitas das recentes inovações das ciências moleculares tem incrementado essa produção.

Sabe-se que mesmo retirando as vísceras o pescado se liquefaz no processo de silagem e que filés ou partes do peixe não se liquefazem quando são cozidas por 15 minutos a 100°C. Para TATTERSON & WINDSOR (1974), as enzimas assim inativadas, certamente seriam as responsáveis pela liquefação.

Segundo WRAY (1988), na indústria de pescado, os métodos para preparação de produtos protéicos pela digestão de peixes com enzimas oferecem potencial comercial considerável. O autor destaca especialmente que, em um caso

específico, resíduos de pescado são tratados com enzimas com o objetivo de se obter liquefação rápida, o que nada mais é que o processo de silagem de pescado.

Muitos pesquisadores tem testado enzimas proteolíticas em biomassa de pescado. Os experimentos são conduzidos para determinar os melhores parâmetros de trabalho para cada enzima como pH, temperatura, relação enzima/substrato e conteúdo de água. Os resultados da utilização de enzimas tem sido animadores quanto ao aspecto comercial e seu potencial de uso (MARTIN & PORTER, s.d.).

2.5.2. Processamento do ensilado

Para STONE & HARDY (1986), o ensilado de pescado produzido pelos métodos convencionais (3-7 dias, pH 4,0) contém uma gama de sistemas que não só hidrolisam as proteínas do pescado até pequenos peptídeos e aminoácidos livres, mas também causam a degradação de aminoácidos até amônia e outros metabólitos.

As enzimas do próprio peixe, ou as adicionadas quebram as proteínas em pequenas unidades solúveis e o ácido acelera suas atividades ao mesmo tempo que previne deterioração bacteriana (TATTERSON & WINDSOR, s.d.).

STABILE & BARUFFALDI (1991) realizaram estudos relacionados à ação enzimática da papaína e protease microbianas, isoladas e em mistura, na solubilização das

proteínas da carne bovina. Os resultados obtidos mostraram que o grau de hidrólise atingido foi de 48,1% para a papaína, 48,6% para a tripsina, 47,1% para a protease microbiana e 41,0% com a mistura de enzimas. Os autores destacam que as enzimas proteolíticas de origem vegetal, tais como a papaína, e a tripsina de origem pancreática, atuam sobre o colágeno e a elastina.

Em trabalho onde se realizou a purificação e a caracterização da proteinase do músculo de tilápias (*Tilapia nilotica* e *Tilapia aurea*) surgem informações que servem de balizamento para a produção de silagem enzimática. Esse estudo indicou que essa enzima é uma proteína aspártica do lisossoma e identificada como a catepsina D, que tem pH ótimo de 3,5 e a temperatura ótima de 37°C. Essa proteína foi inibida por Hg^{+2} e Fe^{+3} e ativada por Ca^{+2} , Ni^{+2} e Mg^{+2} , tendo como função principal a quebra de tecidos proteicos (JIANG et al., 1991b).

Segundo os mesmos autores, que trataram também da purificação e caracterização de proteases do trato digestivo de camarões (*Penaeus monodon*), foram extraídas quatro frações (A,B,C e D). As frações A,C e D são semelhantes à tripsina enquanto a B, é cromatograficamente parecida com a protease. Pesquisaram a temperatura ótima, que foi de 65°C para as frações A,B e C; o pH ótimo, que foi de 8,0 para as frações A,C e B e 7,0 para a fração D. A inativação de 50% da atividade enzimática em 5 minutos

ocorreu a 67°C para a protease B e 50°C para as proteases A, C e D. Os autores sugerem que a atividade enzimática proteolítica pode ser minimizada se o peixe for estocado sob condições ácidas (JIANG et al., 1991a).

CHOORIT & PRASERTSAN (1992) procederam a caracterização das proteases produzidas pelos organismos que fermentam o "Budu" (produto fermentado de pescado). A atividade enzimática proteolítica foi determinada e o pH ótimo indicado ficou entre 7,0 e 8,0 a uma temperatura de 55°C. As proteases conservaram 40% de sua atividade original na faixa de 20°C, mas foram inativadas a 65°C por períodos variáveis de 20 a 30 minutos.

A taxa de extensão da proteólise em silagem pode ser aumentada pelo uso de bromelina a 0,2%, quando a taxa de conversão protéica chega a 75% após 24 horas. O uso de papaína em concentrações de 0,1 a 0,4% em relação à biomassa leva a hidrólise após 9 horas chegando a 80% de conversão protéica (BEDDOWS et al., 1976; LEON et al., 1990).

Pouco se conhece sobre o mecanismo de autólise em tecidos de peixes na silagem. A liquefação que ocorre durante o processo de ensilagem é o resultado da ação enzimática, uma vez que o pescado cozido não se liquefaz. Presume-se que a autólise em silagens feitas com o pescado inteiro ocorre principalmente devido às enzimas das vísceras que são distribuídas pela massa do peixe após a moagem. A liquefação da silagem é marcadamente favorecida a pH's ácidos

e a temperaturas acima da ambiente (TATTERSON & WINDSOR, 1974).

2.5.3. Fases da autólise

A autólise produz uma fase lipídica, uma fase aquosa solúvel que contém mais proteína, mas poucos lipídeos e um sedimento insolúvel de proteína e de lipídeos. A composição de aminoácidos da fase solúvel difere da do sedimento; a última não contém hidroxiprolina e tem relativamente altos níveis de aminoácidos aromáticos e de cisteína/cistina. O sedimento que permanece após a autólise é muito resistente à atividade da protease presente nas vísceras. Também, quando enzimas comerciais são adicionadas para solubilizar os tecidos dos peixes, um resíduo insolúvel permanece. Na prática, é importante que se minimize a produção deste sedimento.

As fases produzidas na autólise podem ser separadas por centrifugação. A fase aquosa solúvel é a mais valiosa, pois contém a maioria da proteína e pouco lipídeo. O colágeno está presente nesta fase solúvel (RAA & GILBERT, 1976).

RAGHUNATH & McCURDY (1987) definem silagem de pescado como sendo um produto da autólise do pescado. Segundo os autores, em pH ácido, as enzimas presentes no peixe, degradam e liquefazem os tecidos, enquanto a degradação por

bactérias é minimizada pela adição de ácido. A degradação é considerada principalmente proteolítica, entretanto, não é completada, daí o aparecimento do resíduo.

Segundo RAGHUNATH & McCURDY (1987), a presença de um resíduo resistente à própria proteólise tem sido bem documentado em silagem de pescado, por vários autores, como também durante a hidrólise das proteínas do pescado com a adição de várias enzimas. Para eles, praticamente 20% do total do nitrogênio originalmente presente não é digerido em peixes de águas frias, e mais de 50% no caso de peixe tropical. A proteína não digerida é geralmente encontrada como um sedimento insolúvel ou borra no fundo do recipiente.

Ainda, de acordo com RAGHUNATH & McCURDY (1987), que fizeram um levantamento das razões para a proteólise incompleta, esta não está claramente explicada, mas pH, temperatura, tempo de ensilagem e procedência do resíduo, afetam a sua extensão. A possibilidade de haver nos resíduos aminoácidos essenciais, que resultam de quebras em sítios específicos por várias proteases, além de altas concentrações de alguns aminoácidos, no sedimento são considerados comuns por muitos autores. O sedimento é deficiente em hidroxiprolina, mas é rico em cisteína. A presença de grande quantidade de cisteína/cistina no sedimento sugere a existência de pontes de dissulfeto, parcialmente responsáveis pela resistência à proteólise.

Foi também identificada experimentalmente a presença de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos no sedimento. Uma ou mais razões são apontadas para sugerir que a pequena solubilidade desses aminoácidos em água pode ser a razão da insolubilidade do sedimento. A deficiência em hidroxiprolina e o baixo conteúdo de glicina levaram alguns pesquisadores a concluir que o colágeno é rapidamente solubilizado durante a ensilagem; enquanto outros estudos mostraram que este fato não ocorre em silagem de peixes tropicais onde a quebra do colágeno é limitada pela resistência desse tipo de colágeno ao efeito do pH ácido e da temperatura durante a ensilagem (RAA & GILBERT, 1976; HALL et al., 1985; RAGHUNATH & McCURDY, 1987).

Segundo HALL et al. (1985) é possível obter uma digestão suplementar do sedimento submetendo-o a dois níveis de pH, digerindo com pepsina (pH 2,0) e com pancreatina e tripsina (pH 7,5). Demonstraram também que mais de 90% do nitrogênio do sedimento é digerível "in vivo" em ensaios com aves.

Sabe-se também que a remoção de gordura do sedimento por extração com isopropanol torna-o ligeiramente mais favorável à digestão (RAA & GILBERT, 1976).

RAGHUNATH & McCURDY (1987), citam outros autores para mencionarem que inibidores de proteinase presente no músculo do bacalhau (*Gadus morhua*), podem ser a razão da proteólise incompleta e que o mesmo fenômeno pode

ser observado na hidrólise de miofibrilas de pescado quando todos os componentes solúveis foram removidos.

SALES et al. (1991), mencionam que o processo de hidrólise enzimica das proteínas justifica-se pelas propriedades funcionais e valor nutricional dos hidrolisados protéicos. Destacam ainda que, a extração e solubilização enzimica das proteínas também representam um meio eficiente para uma melhor utilização das fontes protéicas disponíveis.

Embora a qualidade nutricional das proteínas devesse, na análise final, ser estabelecida com os ensaios biológicos, métodos "in vitro" de avaliação da proteína, são adequados à seleção de novos alimentos protéicos e de métodos de processamento devido a sua rapidez. O índice de digestibilidade pepsina/pancreatina, para a avaliação da qualidade da proteína dá um índice de aminoácidos, baseado na liberação dos aminoácidos por pepsina seguida por pancreatina e que é avaliado em autoanalisador automático (AKESON & STAHMANN, 1964; RODRIGUEZ et al., 1990a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria prima

3.1.1. Preparação da massa homogênea

A matéria prima constituiu-se de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) na forma congelada acondicionada em sacos plásticos, provenientes do mercado atacadista de Piracicaba e assim transportada até o Laboratório de Pescado do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Procedeu-se a evisceração, descabeçamento e eliminação da cauda. A seguir, o material foi picado manualmente constituindo-se de porções íntegras e heterogêneas permanecendo nestas, as escamas, nadadeiras e partes da coluna vertebral. A seguir, o material foi moído em equipamento elétrico Hobart, modelo "H", de aço inoxidável e apresentou-se como uma massa homogênea.

Este procedimento foi feito afim de simular o material residual comestível comumente descartado na

indústria. A coleta direta na indústria não foi feita porque o transporte até o laboratório exigiria um meio adicional de conservação dos resíduos e assim descaracterizaria a matéria prima. Além disso, o resíduo industrial se constitui em matéria bruta, sem triagem da parte comestível.

3.1.2. Enzimas

Foram utilizadas enzimas comerciais produzidas pela Sigma Chemical Corporation dos Estados Unidos, a saber: Pepsina A, produzida a partir da mucosa do estômago de suíno com 91 unidades/mg de sólidos, e Protease, tipo II do *Aspergillus oryzae*, com 0,13 unidades/mg de sólidos.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo da silagem química

A massa homogênea preparada como em 3.3.1. foi dividida em lotes e colocada em 13 beakers de 2.000 ml cada um. Cada becker recebeu 500g de massa homogênea e uma mistura de ácido fórmico a 88% e propiônico a 100% na proporção de 1:1.

A mistura de ácidos adicionada, guardou a relação de 3% (v/p) em relação à massa do material que foi

acidificado (KOMPIANG, 1981). Portanto, cada beacker, recebeu 15,95 ml da mistura de ácidos.

A massa foi revolvida manualmente com espátula para a acidificação se tornar homogênea.

Dos 13 beackers, 5 foram mantidos como silagem química por 4 semanas. Um deles analisado logo após o preparo e considerado como tempo inicial e os demais analisados semanalmente, mantidos à temperatura média de 26°C e cobertos com tela.

3.2.2. Preparo da silagem enzimática

As silagens enzimáticas foram preparadas a partir da silagem química, decorridos 4 dias do tempo inicial quando o pH da mistura já havia se estabilizado.

Foram utilizados 8 beackers de 2.000 ml cada um. Quatro deles foram identificados como silagem enzimática com emprêgo da pepsina e os outros como silagem enzimática com emprego da protease.

A cada um dos beackers foram adicionados 500ml de água destilada para favorecer a mistura das enzimas à massa e conforme recomendado por STABILE & BARUFFALDI (1991).

Ambas as enzimas foram empregadas utilizando-se a razão enzima/substrato observando-se as unidades ativas especificadas para cada enzima e o teor de proteína da matéria prima, analisado conforme o item 3.2.5.2.

Os sistemas enzimáticos foram revolvidos com espátula e mantidos a temperatura ambiente média de 26°C, cobertos com tela.

O tempo inicial considerado, foi referente a 48 horas após a adição das enzimas. Os demais foram analisados semanalmente.

3.2.3. Avaliação Visual

Após a preparação das silagens foi feito um acompanhamento sensorial visando cor, aroma, textura (consistência) e eventual separação de fases, através da indicação volumétrica dos beakers.

3.2.4. Coleta de amostras das silagens para análise

Os sistemas foram revolvidos antes de cada coleta.

Foram coletadas amostras logo após sua preparação e semanalmente. Assim, para a silagem química coletou-se 5 amostras (início, 1, 2, 3 e 4 semanas), para a enzimática com pepsina, 4 (início = 48h, 1, 2 e 3 semanas) e para a enzimática com protease, 2 (início = 48h e 1 semana).

3.2.5. Análises químicas

3.2.5.1. Determinação do pH

O pH foi determinado periodicamente em pHmetro digital, que proporciona leitura de duas casas decimais, sempre precedido de revolvimento da massa.

3.2.5.2. Composição centesimal

As análises químicas para Umidade, Proteína Bruta, Lipídeos e Cinza foram realizadas de acordo com a metodologia indicada pela AOAC (1975) em triplicata, na matéria prima e em cada uma das amostras coletadas e calculadas em base seca.

O teor de Nitrogênio Total foi determinado pelo método Microkjeldhal, sendo o teor protéico determinado multiplicando-se o conteúdo de Nitrogênio Total pelo fator 6,25.

Os lipídeos foram determinados utilizando-se o extrator de Soxhlet. Na extração, utilizou-se como solvente o éter etílico a temperatura de 40-50°C em refluxo contínuo da amostra por 8 horas. Recuperado o solvente, os balões foram retirados e colocados em estufa por 20 minutos a 100°C, deixando esfriar em dessecador e pesados, obtendo-se a massa de extrato etéreo por diferença do peso do balão.

A cinza foi obtida incinerando a amostra em mufla a temperatura de 600°C por 2 horas.

3.2.5.3. Determinação de Nitrogênio não Protéico

O Nitrogênio não Protéico foi determinado segundo o método citado por MEZINCESCU & SZABO (1936), utilizando o ácido tricloroacético para precipitar o nitrogênio proveniente da proteína.

3.2.5.4. Nitrogênio Protéico

O Nitrogênio Protéico foi determinado subtraindo-se do Nitrogênio Total, o Nitrogênio não Protéico.

3.2.5.5. Digestibilidade "in vitro"

A digestibilidade "in vitro" foi determinada segundo metodologia descrita por AKESON & STAHMANN (1964), a qual se baseia na hidrólise enzimática das proteínas com pepsina e pancreatina, seguida da determinação do nitrogênio não precipitável com ácido pícrico. A amostra foi misturada com solução de pepsina na concentração de 3mg/ml em HCl 0,1N e deixada a 37°C por 3 horas. Posteriormente, foi neutralizada com NaOH 0,1N e adicionada solução de

pancreatina na concentração de 0,4% em tampão fosfato 0,1M à pH 8,0 sendo incubada a mistura por 24 horas sob agitação a 37°C. Posteriormente centrifugou-se a 11.000 x G por 15 minutos, acrescentando-se, para cada parte do sobrenadante, 5 partes de ácido pícrico, sendo determinado o nitrogênio através de Microkjeldahl, como descrito anteriormente.

3.2.5.6. Análise de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados segundo a técnica de HARTMAN & LAGO, (1973), utilizando cromatógrafo a gás com as seguintes especificações:

- Coluna cromatográfica de sílica fundida.
- Programação de temperatura: 150°C e por 15 minutos e, aquecimento a 150°C e 210°C a uma velocidade de 3°C/minuto permanecendo a 210°C por 5 minutos a esta temperatura.
- Temperatura do vaporizador: 230°C.
- Temperatura do detector: 250°C.
- Gás de arraste: H₂.
- Fluxo de gases para o detector de ionização de chama: H₂ = 40 ml/min.; N₂ = 40 ml/min.; ar comprimido = 300 ml/min.
- Razão de divisão da amostra no injetor = 1/100
- Integrador utilizado C.G. 300.

- Padrão utilizado: ester metílico do ácido 1-decanóico.

A identificação e quantificação dos ácidos graxos foi obtida por comparação do tempo de retenção e área de pico dos ácidos graxos desconhecidos com o do padrão utilizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fluxograma para produção de silagens de pescado

4.1.1. Etapas do preparo

A coleta da matéria prima depende de um manejo planejado ou pré estabelecido a ser implantado na linha de processamento. Assim este fluxograma, se aplicado na indústria se iniciaria na etapa de desintegração/homogeneização, seguida do tratamento químico imediato.

Uma triagem se faz necessária, à medida que a empresa se proponha a elaborar a silagem para uso em rações e para consumo humano, pois para este último emprego o descarte das vísceras é imprescindível. Outras partes consideradas não comestíveis, como as cabeças e as caudas, podem, no entanto, se tornarem comestíveis após o efeito dos ácidos e das enzimas no processamento da silagem.

Pelo fato da silagem como produto para consumo se constituir de um material liquefeito, qualquer parte do pescado estará descaracterizada, assim, tecido ósseo, muscular (sobras de filetagem e tecidos mais escuros) ou ainda as escamas estarão compondo uma biomassa única.

Ao se propor que uma experiência de laboratório passe a indústria, deve-se orientar quanto ao "scale up" do processo. Assim, ao se adotar o fluxograma por nós proposto, a indústria deve planejar a aquisição e a distribuição nas plantas dos tanques para adição de ácidos e enzimas com condições de revolvimento da massa.

Na industrialização de alimentos, do futuro, não haverá perdas desta natureza conforme discutido por vários autores (DISNEY et al., 1977; LISTON, 1977; HORISBERGER, 1979; MORAIS & MARTINS, 1981; TENUTA FILHO, 1983; KARMAS & LAUBIER, 1987; ALMAS, 1989; OTTATI et al., 1990; RODRIGUEZ et al., 1990a e b; UNITED Nations..., 1991; BIMBO & CROWTHER, 1992; GREENSHIELDS, 1992; OETTERER et al., 1992; SANKAR & SOLANKI, 1992; JONES, 1974).

A política é fazer com que todo empresário de pesca dê um destino ao material residual para que este seja uma nova fonte de renda, conforme dito por REGENSTEIN (1990), o que é perfeitamente viável seguindo o fluxograma proposto nesta pesquisa.

A silagem química conforme indicada no fluxograma para produção da silagem de pescado, é um procedimento simples e de baixo custo, elaborada basicamente conforme preconizado pela maioria dos autores que estudaram silagem de pescado e respeitando o que já está em uso em alguns países europeus (DISNEY, 1977; KOMPIANG, 1981; HAARD et al., 1985).

As variações encontradas na literatura estão circunscritas ao aspecto da adição de diferentes ácidos ou misturas de ácidos, além da relação entre eles ou em relação à matéria-prima utilizada.

A adição de ácidos é etapa fundamental para a conservação da biomassa do pescado, constituindo-se em uma

primeira etapa indispensável para a elaboração da silagem enzimática.

O tratamento ácido é que permite o acúmulo de material residual até volume suficiente para processamento, evitando o descarte periódico de poucos volumes, conforme ocorre na Indonésia, segundo KOMPIANG (1981). Já para a fabricação de farinha de peixes, há necessidade de grandes volumes e desidratação imediata, conforme explicado pelo mesmo autor.

As enzimas empregadas foram a pepsina e a protease fúngica, esta última considerada a mais utilizada para hidrolisar matéria prima pesqueira, segundo MEINKE & MATTIL (1973); a pepsina pode ser extraída das próprias vísceras do pescado.

A pepsina, de acordo com GRAY (1988), tem o poder de acelerar o processo de digestão protéica de resíduos de pescado, onde se poderia obter produtos que oferecem potencial comercial considerável. Este potencial é discutido também por MARTIN & PORTER (s.d.).

SALES et al. (1991), justificam o uso de enzimas para obtenção dos produtos de pescado na melhoria das propriedades funcionais das proteínas e no melhor valor nutricional.

4.1.2. Avaliação sensorial das silagens

4.1.2.1. Silagem química

Segundo DISNEY et al. (1977); HAARD et al. (1985) e ESPE & NJAA (1989), o grau de hidrólise é um critério usado para avaliar a silagem de pescado, e este está diretamente proporcional à liquefação que ocorre ao longo do armazenamento. A avaliação visual acompanhada da avaliação química definem o tempo necessário para o produto ser comercializado.

Pelo exame visual das silagens, observou-se que a liquefação aumentou gradativamente até o final do experimento, o que ratifica o trabalho de HAARD et al. (1985), onde afirmam que a proteína da silagem de pescado é continuamente hidrolisada por pelo menos um mês.

O odor levemente ácido e a estabilidade do sistema também foram observados confirmando os relatos de TATTERSON & WINDSOR (1974) e KOMPIANG (1981) para sistemas semelhantes ao elaborado neste experimento empregando 3% (v/p) da mistura de ácido fórmico e propiônico (1:1).

A silagem manteve-se de coloração marrom claro sem o desenvolvimento aparente de microrganismos pelo período estudado, como o previsto por GILBERT & RAA (1977) e KOMPIANG (1981).

Neste experimento a liquefação da silagem se iniciou após 2 dias, em temperatura média de 26°C, sem separação de fases.

A avaliação visual da liquefação do sistema, segundo TATTERSON & WINDSOR (s.d.); WINDSOR (1979) e STROM & EGGUM (1981), deveria apresentar-se hidrolisada após 2 dias a 20°C e com possibilidade de uma separação mecânica em 3 fases. Para DISNEY et al. (1977), a temperatura de 30°C próxima a de 26°C por nós utilizada favorece a liquefação.

4.1.2.2. Silagem enzimática

A utilização das enzimas teve como objetivo acelerar e facilitar o processo de silagem química para que a relação grau de hidrólise da proteína/tempo fosse diminuída e o custo final do produto também.

A separação em fases como a mencionada por autores como RAA & GILBERT (1976), HALL et al. (1985) e RAGHUNATH & Mc CURDY (1987), da silagem enzimática, depende de muitos fatores como pH, temperatura e procedência do resíduo.

Neste trabalho não foi observada a separação nas 3 fases comumente citada na literatura; estas fases seriam a lipídica, a aquosa (rica em proteína) e o sedimento insolúvel de proteína.

Após 24 horas da adição das enzimas e até o final do experimento, observou-se somente 2 fases. A primeira, superior, gordurosa, de cor amarela, com um volume aproximado de 10% do total.

A segunda fase da silagem se apresentou com uma cor acinzentada e mais liquefeita do que a silagem química. Não houve sedimento, o que na prática é importante, uma vez que esta fração se constitui em um novo resíduo.

Antes de cada coleta de amostras o sistema foi revolvido manualmente e as fases foram incorporadas e após 3 a 4 horas de repouso as 2 fases novamente se estabeleceram.

Cabe ressaltar que a silagem enzimática com protease teve visualmente sua eficiência de hidrólise muito maior e mais rápida do que a pepsina. A cor da silagem enzimática com protease se mostrou mais "castanha" ou marrom que as demais. Seu odor foi mais forte, lembrando odor "amoniacal".

TATTERSON (1976) discutiu as mudanças que ocorrem com os lipídeos durante o armazenamento da silagem, e menciona que o escurecimento pode ser consequência de reações oxidativas.

A silagem de pescado contém uma gama de sistemas que não só hidrolisam as proteínas do pescado, mas também causam a degradação dos aminoácidos até amônia e outros produtos metabólitos (STONE & HARDY, 1986). GILBERT & RAA (1977) também discutiram a presença do odor de amônia e

o atribuíram às reações de desanimação catalizadas pelas enzimas endógenas do material utilizado.

O material hidrolisado pela protease fúngica apresentou-se com aspecto de verniz (brilho) marrom e com características elásticas após a secagem.

Pode-se supor que, a fração lipídica da sardinha tenha sido hidrolisada pelas enzimas lipolíticas normalmente presentes nestes peixes (DISNEY et al., 1977), o que levaria provavelmente, segundo os autores, o produto a apresentar aspecto de "melaço".

A viscosidade da silagem pode também ser atribuída à presença da fração lipídica em maior quantidade como discutido por HAARD et al. (1985).

Talvez pudéssemos sugerir a remoção da fase lipídica da silagem enzimática, mecanicamente para evitar as reações que ocorrem no início do processo como constataram DISNEY et al. (1977) e evitar a hidrólise dos glicerídeos por enzimas. A remoção dos lipídeos proporcionaria ainda um aumento do aproveitamento da proteína da silagem como alimento, segundo STROM & EGGUM (1981). No entanto, a operação de remoção dos lipídeos é onerosa, se feita por extração com solventes, conforme discutido por WINDSOR (1979), e no presente experimento objetivou-se a produção da silagem de baixo investimento.

4.2. Análises químicas

4.2.1. pH das silagens

Tabela 1. pH das silagens em diferentes tempos de armazenamento.

pH	Silagem Química	Silagem Enzimática (Pepsina)	Silagem Enzimática (Protease Fúngica)
Início	3,76	3,84	3,82
Tempo 48h		3,80	3,79
Tempo 1	3,81	3,78	3,78
Tempo 2	3,82	3,79	3,79
Tempo 3	3,83	3,86	4,02
Tempo 4	3,85	3,88	4,16

Tempo 48h = Tempo inicial para as silagens enzimáticas.
Tempos 1, 2, 3 e 4 = em semanas.

4.2.1.1. Silagem química

O pH dos sistemas ao longo do período estudado, variou de 3,76 a 3,85, conforme se observa na Tabela 1, proporcionando junto com a ação bactericida do ácido propiônico, um fator de estabilidade, como aconteceu em trabalhos de outros autores.

O pH ácido dos sistemas (abaixo de 4,5) aliado à ação bactericida do ácido propiônico são fatores importantes à estabilidade destes. A idéia é de que a preservação não depende somente da acidez, mas também da

escolha do ácido que tenha uma forte ação bactericida. Nessas circunstâncias, misturas com pH mais alto são aceitáveis (TATTERSON & WINDSOR, 1974; BACKHOFF, 1976; GILBERT & RAA, 1977; STROM et al., 1979; KOMPIANG, 1981).

Empregando-se os ácidos orgânicos fórmico e propiônico, obtêm-se uma silagem com leve odor ácido, embora os ácidos orgânicos sejam mais onerosos do que os minerais; além disso, para a manipulação na indústria, os ácidos orgânicos são menos corrosivos que os minerais (TATTERSON & WINDSOR, 1974; DISNEY et al., 1977; KOMPIANG, 1981).

4.2.1.2. Silagem enzimática

As variações no pH para a silagem enzimática com pepsina foram de 3,84 a 3,88 e para a silagem enzimática com protease, de 3,82 a 4,16, conforme os dados da Tabela 1.

Cabe discutir aqui, que as adições de água e enzimas, provavelmente tenham sido os fatores que elevaram o pH da silagem química tomada como base para a produção das silagens enzimáticas.

A silagem química (ácida) favorece a ação das enzimas proteolíticas que tem seu pH ótimo na faixa de 3 a 4 segundo MEINKE & MATTIL (1973). Outros autores como JIANG et al. (1991b) afirmam que a atividade proteolítica pode ser minimizada se o peixe for estocado sob condições ácidas.

Para CHOORIT & PRASERTSAN (1992), em ensaios para preparo de "Budu" determinaram o pH ótimo para as proteases como sendo entre 7,0 e 8,0 a temperatura de 55°C; na temperatura de 20°C conservam 40% da sua atividade original.

4.2.2. Composição centesimal das silagens

Tabela 2. Umidade das silagens química e enzimáticas em diferentes tempos de armazenamento.

Umidade (%)	Silagem Química	Silagem Enzimática (Pepsina)	Silagem Enzimática (Protease Fúngica)
Matéria prima	74,12 ± 0,03		
Início	74,33 ± 0,04		
Tempo 48h		86,05 ± 0,05	85,61 ± 0,04
Tempo 1	69,15 ± 0,02	84,78 ± 0,01	83,76 ± 0,05
Tempo 2	68,90 ± 0,02	84,98 ± 0,01	84,54 ± 0,04
Tempo 3	64,69 ± 0,33	83,57 ± 0,05	83,68 ± 0,01
Tempo 4	58,14 ± 0,72		

Tempo 48h = Tempo inicial para as silagens enzimáticas
Tempos 1, 2, 3 e 4 = em semanas

Tabela 3. Proteínas das silagens química e enzimáticas em diferentes tempos de armazenamento.

Proteína (%)	Silagem Química		Silagem Enzimática (Pepsina)		Silagem Enzimática (Protease Fúngica)	
	m.u.	m.s.	m.u.	m.s.	m.u.	m.s.
Matéria prima	19,36	74,79±0,24				
Início	18,73	72,95±0,45				
Tempo 48h			9,66	69,23±1,02	9,75	67,76±0,38
Tempo 1	21,71	70,37±0,85	10,20	67,00±0,21	10,95	67,41±1,27
Tempo 2	21,00	67,53±0,03	10,53	70,13±1,01	10,62	65,07±0,71
Tempo 3	23,88	67,62±0,09	10,85	66,01±0,06		
Tempo 4	28,42	67,89±0,72				

Tempo 48h = Tempo inicial para as silagens enzimáticas

Tempos 1, 2, 3 e 4 = em semanas

m.u = Matéria úmida

m.s. = Matéria Seca

Tabela 4. Lipídeos das silagens química e enzimáticas em diferentes tempos de armazenamento.

Lipídeos (%)	Silagem Química		Silagem Enzimática (Pepsina)		Silagem Enzimática (Protease Fúngica)	
	m.u.	m.s.	m.u.	m.s.	m.u.	m.s.
Matéria prima	2,37	9,16±0,12				
Início	2,07	8,07±0,011				
Tempo 48h			1,22	8,73±0,06	1,11	7,70±0,00
Tempo 1	2,85	9,23±0,02	1,32	8,65±0,10	1,16	7,17±0,01
Tempo 2	2,75	8,85±0,04	1,42	9,48±0,01		
Tempo 3	3,20	9,07±0,01	1,33	8,08±0,07		
Tempo 4	3,59	8,58±0,04				

Tempo 48h = Tempo inicial para as silagens enzimáticas

Tempos 1, 2, 3 e 4 = em semanas

m.u = Matéria úmida

m.s. = Matéria Seca

Tabela 5. Fração Cinza das silagens química e enzimáticas em diferentes tempos de armazenamento.

Cinza (%)	Silagem Química		Silagem Enzimática (Pepsina)		Silagem Enzimática (Protease Fúngica)	
	m.u.	m.s.	m.u.	m.s.	m.u.	m.s.
Matéria prima	3,61	15,95±0,61				
Início	3,14	12,23±0,76				
Tempo 48h			1,70	12,21±0,11	1,74	12,08±0,15
Tempo 1	3,67	11,89±0,16	1,77	11,62±0,21	2,06	12,68±0,03
Tempo 2	4,18	13,43±1,38	1,67	11,11±0,12		
Tempo 3	4,45	12,60±0,09	1,89	11,53±0,14		
Tempo 4	5,44	12,99±0,06				

Tempo 48h = Tempo inicial para as silagens enzimáticas

Tempos 1, 2, 3 e 4 = em semanas

m.u = Matéria úmida

m.s. = Matéria Seca

4.2.2.1. Composição da silagem química

Os autores que avaliaram nutricionalmente a silagem são unânimes em afirmar que a composição da silagem é muito semelhante a do material que lhe deu origem. A única ressalva se faz a uma pequena diluição provocada pela adição dos ácidos à matéria-prima (TATTERSON & WINDSOR, s.d.; DISNEY et al., 1977; KOMPIANG, 1981).

Os resultados por nós verificados confirmam esta previsão. As variações da composição centesimal das silagens ao longo do tempo estudado, foram semelhantes quando comparadas à matéria-prima.

A silagem química de sardinhas pode ser, portanto, utilizada diretamente para preparo de rações para suínos, por exemplo, conforme discutido por KOMPIANG (1981).

De acordo com a Tabela 2, vê-se que com o passar do tempo de armazenamento da silagem química, houve diminuição no teor de umidade provocada pelo ressecamento da massa, mantida em beckers ao ambiente, assim, de 74,33% de umidade presente no início do experimento, desidratações foram ocorrendo e ao final de 4 semanas a umidade passou a ser de 58,14%.

A fração protéica das silagens químicas (Tabela 3) variou tendendo a diminuir com o armazenamento, mas até 1 semana, depois permanecendo constante até a quarta semana. Assim, considerando os valores em matéria seca, a silagem química de sardinha apresenta valor protéico mais elevado logo após o preparo, perdendo 3,6% de proteína bruta após uma semana de armazenamento e 7,6% após 2 semanas de armazenamento.

ESPE & NJAA (1989) e RAA & NJAA (1989) explicaram que o maior valor nutritivo da silagem está indiretamente relacionado com o tempo prolongado de amostragem. Assim, em relação, apenas à proteína total, podemos dizer que é melhor a utilização da silagem química, logo após o preparo e após no máximo, uma semana de armazenamento. STONE & HARDY (1986) também concordam que a silagem "fresca" é nutricionalmente superior a silagem

estocada pois com o correr do tempo haverá o acúmulo de produtos de degradação.

Os teores de lipídeos totais da silagem química, apresentados na Tabela 4, praticamente não foram afetados com o armazenamento, permanecendo aproximadamente em 9% com relação à matéria seca. Conforme discutido no item 4.1.2.2. a fração lipídica pode ser considerada como um interferente indesejável no produto silagem e portanto, há a recomendação de alguns autores para que ela seja removida do processo (DISNEY et al., 1977; WINDSOR, 1979; STROM & EGGUM, 1981).

A fração cinza (Tabela 5) praticamente não se alterou com o armazenamento; as pequenas variações estão dentro das respostas à acuidade da metodologia de análise. Deve ser considerada, quanto ao aspecto nutritivo, juntamente com a fração protéica, para uso como ração e/ou alimento humano.

A composição da silagem química de sardinhas nos tempos 1 e 4 foi de 74,33% e 58,14% de umidade, 18,73% e 28,42% de proteína, 2,85% e 3,59% de lipídeos e 3,14% e 5,44% de cinza. SALES et al. (1992), em silagem de tilápia, encontraram após 90 dias de armazenamento, 74,64% de umidade, 14,90% de proteína, 5,72% de lipídeos e 3,74% de cinza.

4.2.2.2. Composição da silagem enzimática

Da mesma forma que no caso da silagem química, em linhas gerais, a composição centesimal das silagens não se apresentou muito diferente da composição da matéria prima.

As porcentagens de umidade das silagens enzimáticas apresentaram-se, na Tabela 2, superiores às da matéria prima, justamente pelo fato de terem sido feitas diluições nas biomassas para se obter um melhor trabalho das enzimas nos respectivos substratos. A partir do tempo inicial de preparo das silagens enzimáticas, houve uma diminuição gradual dos teores de umidade até a terceira semana do experimento, também explicada, conforme o item anterior pela desidratação da massa.

A adição de água resultou em leve alteração do pH, conforme foi discutido no item 4.2.1.2.

A fração protéica das silagens enzimáticas sofrem pequena variação, como se observa na Tabela 3, com tendência a diminuir com o tempo de armazenamento, da mesma forma como ocorre para a silagem química, em termos de matéria seca.

Comparando-se as silagens enzimáticas com a silagem química, em termos de proteína bruta na matéria úmida nota-se uma diferença acentuada provocada pela diluição da biomassa no caso das silagens enzimáticas.

Comparando-se as duas silagens enzimáticas observa-se que os maiores teores de proteína, em matéria seca ocorrem no tempo inicial, logo após o preparo da silagem. Após uma semana de armazenamento, há uma queda nesta fração, sugerindo, portanto que as silagens enzimáticas estão prontas para utilização logo após o preparo. Um intervalo de tempo melhor para acompanhamento do processo enzimático neste experimento, poderia ter sido, o diário, pois em algumas horas a hidrólise se processa, as silagens se liquefazem e provavelmente, a partir da primeira semana, começam a ocorrer as alterações indesejáveis como a diminuição do teor de proteína.

Na Tabela 4, vê-se que a fração lipídica das silagens enzimáticas foi ligeiramente inferior à matéria prima no tempo inicial (48 horas após o início da silagem química), particularmente na silagem enzimática com protease fúngica que mostrou uma queda na matéria seca de 19% em lipídeos totais. O teor menor em lipídeos é benéfico para a silagem pois, conforme foi discutido no item anterior, a gordura é considerada interferente no processo de silagem.

A fração cinza (Tabela 5), nas silagens enzimáticas, foi menor do que a da silagem química. Para a silagem com pepsina ela foi superior, no início do experimento em relação aos períodos de armazenamento, podendo-se também sugerir a utilização da silagem logo após

o preparo considerando ser esta mais nutritiva por conter mais minerais.

4.2.3. Composição em ácidos graxos das silagens

Tabela 6. Composição em Ácidos Graxos das silagens em diferentes tempos de armazenamento.

Ácidos Graxos (g/100g da amostra)		Silagem Química			Silagem Enzimática	
Ácido Graxo		Matéria Prima	Início	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 48h
14:0	Mistérico	5,87	6,87	6,18	5,86	6,63
15:0	Pentadecanóico	0,83	1,22	0,78	0,74	traços
16:0	Palmitico	17,70	21,00	21,06	19,46	22,66
16:1	Palmitolêico	17,47	17,45	15,90	16,18	13,60
17:0	Heptadecanóico	1,86	2,09	1,66	1,77	1,06
18:0	Estearico	4,22	4,81	4,40	3,39	3,96
18:1	Oléico	12,01	14,22	12,69	13,74	15,01
18:2	Linolêico	1,86	2,45	1,64	2,45	2,48
18:3	Linolênico	3,74	2,87	3,11	1,34	traços
18:4	Octadecatetraenóico	1,55	1,19	1,16	1,53	1,31
20:4	Araquidônico	1,37	1,16	0,96	1,62	1,48
20:5	Eicosapentaenóico	8,24	6,55	7,79	7,92	7,82
22:5	Docosapentaenóico	0,95	0,87	0,96	0,83	1,00
22:6	Docosaheptaenóico	17,40	12,25	16,72	18,21	17,99

Tempo 48h = tempo inicial para a silagem enzimática.

Tempos 1 e 2 = semanas

Conforme apresentado na Tabela 6, os ácidos graxos presentes na fração lipídica do material residual de sardinhas, são predominantemente os insaturados como o palmitolêico, 17,47%, o docosaheptaenóico, 17,40%, e o oléico, 12,01%. Dentre os saturados, o palmítico aparece em maior quantidade, 17,70%.

Após o preparo da silagem química e da silagem enzimática com pepsina, observa-se uma alteração nos teores de vários ácidos graxos, com diminuição no palmitolêico, que passa de 17,45% a 13,60% na silagem enzimática e a 15,90% após uma semana de armazenamento da silagem química; também o linolênico cai de 2,87% para se apresentar apenas em traços após 48 horas na silagem enzimática.

A oxidação dos ácidos graxos insaturados é discutida por alguns autores que afirmam ser a fração lipídica, por esta razão, indesejável na silagem (TATTERSON & WINSOR, s.d.). O aumento de ácidos graxos livres pode levar a um índice de acidez de 50 a 60, que corresponde a 20% de ácidos graxos livres durante a estocagem, conforme experimentos de BACKHOFF (1976) e STROM et al. (1979). Um teor de até 3% de ácidos graxos livres é desejável para não haver escurecimento da silagem, segundo DISNEY et al. (1977). Além disso, para KOMPIANG (1981), há uma relação direta entre o escurecimento provocado por reações dos lipídeos com a perda do valor nutricional.

4.2.4. Frações nitrogenadas das silagens

Tabela 7. Teores de Nitrogênio Total, Nitrogênio não Protéico; e Nitrogênio Protéico nas silagens em diferentes tempos de armazenamento.

	Silagem Química	Silagem Enzimática (Pepsina)	Silagem Enzimática (Protease Fúngica)
Nitrogênio Total* (%)			
Matéria Prima	11,97		
Início	11,67		
Tempo 48h		11,08	10,84
Tempo 1	11,26	10,72	10,78
Tempo 2	10,80	11,22	10,41
Tempo 3	10,82	10,56	
Tempo 4	10,86		
Nitrogênio Não Protéico* (%)			
Matéria Prima	2,33		
Início	2,13		
Tempo 48h		6,55	7,25
Tempo 1	3,90	6,58	8,70
Tempo 2	4,48	6,32	
Tempo 3	4,84	6,16	
Tempo 4	3,94		
Nitrogênio Protéico* (%)			
Matéria Prima	9,63		
Início	9,54		
Tempo 48h		4,53	3,59
Tempo 1	7,35	4,14	2,08
Tempo 2	6,32	4,90	
Tempo 3	5,97	4,40	
Tempo 4	6,92		

* = Em Matéria Seca.

Tempo 48h = Tempo inicial para as silagens enzimáticas.

Tempos 1, 2, 3 e 4 = semanas.

Tabela 8. Digestibilidade "in vitro" das silagens em diferentes tempos de armazenamento.

	Silagem Química	Silagem Enzimática (Pepsina)	Silagem Enzimática (Protease Fúngica)
	Digestibilidade (%)		
Matéria Prima	67,60		
Início	64,70		
Tempo 48h		69,50	67,20
Tempo 1	68,00	66,90	71,70
Tempo 2	68,50	69,20	
Tempo 3	66,40	68,30	
Tempo 4	71,80		

Tempo 48h = Tempo inicial para a silagem enzimática.

Tempos 1, 2, 3 e 4 = em semanas.

4.2.4.1. Silagem química

A fração nitrogenada dos sistemas de silagem química foi analisada levando-se em conta os valores de Nitrogênio Total, Nitrogênio Protéico, Nitrogênio não Protéico e digestibilidade "in vitro".

Conforme se observa na Tabela 7, os valores de Nitrogênio Total mostraram uma tendência de queda ao longo das semanas comparando-se os teores desde a matéria prima até o final do experimento.

Algumas transformações que devem ocorrer são observadas pelas comparações dos valores de Nitrogênio Protéico e não Protéico; percebe-se uma correlação inversa destes valores ao longo do tempo.

Tais resultados estão de acordo com TATTERSON & WINDSOR (1974) que estudaram as modificações do Nitrogênio, indicando que ocorre uma rápida quebra ou hidrólise das proteínas de baixo peso molecular a aminoácidos livres. Essas transformações só não foram da mesma magnitude por eles relatada (75 a 85%), pois até o final do experimento 36,28% do Nitrogênio Total estava sob a forma de não Proteico.

Sob condições específicas de estudo, BACHHOFF (1976), analisou silagem preparada com vísceras de bacalhau e verificou a formação de Nitrogênio não Proteico inversamente proporcional aos valores de Nitrogênio Proteico após a estocagem da silagem.

SALES et al. (1992), elaboraram silagem de tilápia (*Sarotherodon niloticus*) com a utilização de ácido fórmico a 3% e acompanharam, como no nosso estudo, o processo de autólise à temperatura ambiente. Após 55 dias de experimento a transformação de Nitrogênio Total a Nitrogênio não Protéico foi da ordem de 55 a 60%. No presente experimento estas relações após o armazenamento de 1, 2, 3 e 4 semanas foram de 34,63%, 41,48%, 44,73% e 36, 27%, respectivamente.

O grau de hidrólise da silagem pode ser aferido pela observação visual, pelas taxas de conversão do Nitrogênio, onde quanto maior o Nitrogênio não Proteico em relação ao Protéico, mais hidrolisado estará o sistema e

finalmente e complementarmente pela digestibilidade que as silagens apresentam após o armazenamento.

Sem descartar a necessidade posterior de ensaios biológicos, para a análise final da qualidade nutricional da silagem, concordamos com AKESON & STAHMANN (1964) que métodos "in vitro" são mais rápidos e adequados à seleção de novos alimentos proteicos e de métodos de processamento.

Segundo ESPE et al. (1989), o valor nutricional da silagem pode ser inferido mas não totalmente confirmado por esse parâmetro. Sua utilidade é importante como sendo um índice químico da qualidade que deve ser complementado por outros índices.

Na Tabela 8, estão os resultados obtidos para digestibilidade "in vitro" para a silagem química. Assim, após o preparo a silagem química apresentou digestibilidade inferior à da matéria prima. Com o armazenamento, após 4 semanas a digestibilidade foi de 71,80%, sendo que no tempo inicial era de 64,70%; após uma semana de armazenamento a digestibilidade foi de 68,00%. Pode-se, portanto, considerar lenta a hidrólise ocorrida na silagem química.

4.2.4.2. Silagem enzimática

Segundo alguns autores (BACKHOFF, 1976; WINDSOR, 1979 e STONE & HARDY, 1986), em silagem química

preparada com vísceras de pescado (onde há enzimas do próprio peixe) e mantidas a 23°C, após 3 dias de armazenamento, 50% do total de Nitrogênio Total estava na forma não Protéica. No presente experimento, na primeira semana de análise, essa conversão, na silagem enzimática, com emprego de pepsina foi de 59,11% após 48 horas e para a silagem preparada com protease fúngica foi de 66,88%

Estes valores para as silagens enzimáticas são muito superiores aos encontrados para a silagem química, que após uma semana de armazenamento foi de 34,63% apenas.

A conversão comparativa entre as silagens enzimáticas mostrou que a silagem com protease fúngica apresenta a taxa de conversão mais elevada, sendo de 66,88% após 48 horas e de 80,70 após uma semana; a silagem preparada com pepsina apresentou respectivamente, para estes valores, 59,11% e 61,38%

Em relação à silagem química, a silagem enzimática com protease fúngica sofreu uma hidrólise muito maior, se compararmos as duas na primeira semana de armazenamento, sendo a conversão de Nitrogênio Total e não Protéico da ordem de 80,70% para a enzimática com protease fúngica e de 34,63% para a química.

É altamente vantajosa a silagem enzimática para ser utilizada como aceleradora do processo químico, principalmente no caso deste experimento onde não foram utilizadas as vísceras do pescado, que eventualmente poderiam

colaborar como aceleradores naturais no processo de ensilagem.

A digestibilidade "in vitro" da silagem enzimática com pepsina atingiu o maior valor, 69,50% após 48 horas de armazenamento, após 3 semanas diminuiu para 66,90%.

Partindo de uma silagem química com 64,70% de digestibilidade atingiu-se o valor máximo nas primeiras 48 horas, caindo na primeira semana e voltando a crescer lentamente nas duas outras semanas. Provavelmente a ação máxima da enzima se fez no período inicial de 48 horas.

Para STONE & HARDY (1986) a silagem "fresca" é nutricionalmente superior à silagem estocada quando não estão acumulados os produtos de degradação. ESPE & NJAA (1989) encontraram maior digestibilidade e maior utilização da proteína na silagem "fresca". Os autores atribuem à autólise a queda da qualidade das silagens estudadas.

A silagem produzida com a enzima protease fúngica apresentou um valor de 67,20% de digestibilidade, próximo ao da matéria prima e chegou no prazo de uma semana a um valor tão alto (71,70%) quanto o atingido pela silagem química após 4 semanas (71,80%). Tal valor confirma a avaliação visual que mostrou uma total liquefação do sistema enzimático em 24 horas.

Os valores de digestibilidade "in vitro" obtidos para a matéria-prima são considerados muito bons. Com

o processamento, na forma de silagem enzimática com Protease, esses valores apresentaram-se ainda melhores.

5. CONCLUSÕES

1 - É viável o preparo das silagens químicas com resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), pescado utilizado nas indústrias brasileiras enlatadoras de pescado, empregando-se os ácidos fórmico e propiônico 1:1 na proporção de 3% em relação à massa residual.

2 - É viável o preparo de silagens enzimáticas a partir de silagem química estável com pH 3,7 e adição das enzimas Pepsina e Protease Fúngica.

3 - A silagem química apresentou-se de coloração marrom claro, odor levemente ácido e textura variável a partir do estado de pasta até a liquefação que se inicia após dois dias e aumenta gradativamente com o armazenamento até quatro semanas.

4 - As silagens enzimáticas apresentaram-se de coloração mais acentuada e odor mais forte em relação à silagem química, principalmente a silagem preparada com Protease fúngica. A liquefação foi rápida, em 24 horas, e

observou-se a separação em duas fases uma superior gordurosa de cor amarela e a segunda de cor acinzentada.

5 - Sugere-se a utilização da enzima Protease Fúngica como aceleradora do processo de ensilagem química e o armazenamento de uma semana como suficiente para a obtenção de silagem com maior conversão do Nitrogênio e maior digestibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAS, K.A. Utilization of marine biomass for production of microbial growth and biochemical. In: **ATLANTIC FISHERY TECHNOLOGY AND SEAFOOD BIOTECHNOLOGY WORKSHOP**, 34., St. John, 1989. **Papers**. Lancaster, Technomic 1989. p.361-6.
- ANDRADE, M. Oetterer. Pescado fermentado. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA U. de A. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo, Edgard Blücher, 1983. p.176-97. (Biotecnologia, 5).
- ANDRADE, M. Oetterer. Aproveitamento tecnológico do pescado. Fermentação para anchovamento. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO**, 6. Fortaleza, 1984. **Anais**. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 1984. 61p.
- ANDRADE, M. Oetterer. Fish overview in Brazil. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23(3/4): 169-78, 1989.

AKESON, W.R. & STAHMANN, M.A. A pepsin pancreatic digest index of protein quality evaluation. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, 83(3): 257-61, 1964.

ANUÁRIO Estatístico do Brasil - 1992, Rio de Janeiro, 52: 578, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 12 ed. Washington, 1975. 1018p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 15 ed. Washington, 1990. p.869-70.

BACHANAN, L.; MATHEWS, S.; SVDHARMA, D.; MUKUNDAN, M.K.; MALIKA, V. Effect of fruit juices with acetic acid on the quality of pickled fish. *Fishery Technology*, Cochín, 29: 40-4, 1992.

BACKHOFF, H.P. Some chemical changes in fish silage. *Journal of Food Technology*, Oxford, 11(4): 353-63, 1976.

BEDDOWS, C.G.; ISMAIL, H.; STEINKRAUS, K.H. The use of bromelin in the hydrolysis of mackerel and the investigation of fermented fish aroma. *Journal of Food Technology*, Oxford, 11:379-88, 1976.

BIMBO, A.P. & CROWTHER, J.B. Fish meal and oil: current uses. *Journal American Oil Chemist's Society*, Chicago, 69(3): 221-7, Mar. 1992.

BRASIL. Ministério da Indústria e Comércio. *Reciclagem dos resíduos urbanos, agropecuários, industriais e minerários, síntese*. Brasília, 1985. 77p.

CHOOBIT, W. & PRASERTSAND, P. Characterization of proteases produced by new isolated and identified proteolytic microorganisms from fermented fish (Budu) world. *Journal of Microbial Biotechnology*, Kampur, 8: 284-6, 1992.

COMPOSTING fish wastes along the great lakes. *BioCycle Journal of Waste Recycling*, Emmaus, 32(5): 54, May 1991.

DISNEY, G.J.; TATTERSON, I.N.; OLLEN, J. Recent development in fish silage. In: *CONFERENCE ON THE HANDLING PROCESSING AND MARKETING OF TROPICAL FISH*, London, 1976. *Proceedings*. London, Tropical Products Institute, 1977. p. 321-40.

ESPE, M. RAA, J.; NJAA, L.R. Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. *Journal of Science Food and Agricultural*, London, 49: 259-70, 1989.

FAO. *Fishery Statistic Yearbook* - 1991, Rome, 73: 100, 104,206, 1993.

FREDERICK, L. Composting fishery by products. *BioCycle Journal of Waste Recycling*, Emmaus, 33(1): 85, Jan. 1992a.

FREDERICK, L. Turning fishery wastes into saleable compost. *BioCycle Journal of Waste Recycling*, Emmaus, 32(9): 85, Sept. 1992b.

FREITAS, J.V.T. & GURGEL, J.J.S. Sobre o aproveitamento de residuos do pescado dos açudes do nordeste, na elaboração de subproduto. *Boletim Técnico do DNOCS*, Fortaleza, 32(2): 139-47, jul/dez. 1976.

GILBERT, A. & RAA, J. Properties of a propionic acid/formic acid preserved silage of food viscera. *Journal of Science Food and Agricultural*, London, 28: 647-53, 1977.

GREENSHIELDS, R.N. The biotech concept and food processing wastes. **Outlook on Agriculture**, Bracknell, 21(2): 99-104, 1992.

GURGEL, J.J.S. & FREITAS, J.V.F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do nordeste brasileiro após beneficiado. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, 31(1): 38-44, jan./jun. 1973.

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 supplement. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, 36: 229-41, 1985.

HALL, G.M.; LEDWARD, D.A.; LAWRIE, R.A. Silage from tropical fish. 2 undigest fraction. **Journal of Food Technology**, Oxford, 20: 573-81, 1985.

HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids, London, **Lab. Pract.**, 1973.

HOOD, L.F. & ZALL, R.R. Recovery, utilization and treatment of seafood processing wastes. **Advanced Fishery Science and Technology**, p.336-61, 1979.

HORISBERGER, M. Lessons from the past for better future utilization of fish resources. In: **NESTLÉ RESEARCH NEWS**. 1978/79. Lausanne, Nestlé Products Technical Assistance, 1979. p.41-9.

HOUSAIN, M.A.; FURVICH, M.; YONE, Y. POV. TBA and VBN values and proximate aminoacid and fatty acid compositions of scrap meals fermented with fungi. **Nippon Suisan, Gakkaishi**, 53(9): 1629-32, 1987.

INSTITUTE of Food Technology. Seafood Products Technology Group, 9(2): 11-3, March. 1992.

JAMES, M.A; IYER, K.M.; NAIR, M.R. Comparative study of fish silage prepared by microbial fermentation and formic acid silage. In: **CONFERENCE ON THE HANDLING PROCESSING AND MARKETING OF TROPICAL FISH**, London, 1977. **Proceedings**, London, Tropical Products Institute, 1977. p. 273-5.

JIANG, S.T.; MOODY, M.W.; CHEN, H.C. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). **Journal of Food Science**, Champaign, 56(2): 322-6, 1991a.

JIANG, S.T.; WANG, Y.T.; CHEN, C.S. Purification and characterization of a proteinase identified as cathepsin D from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* X *Tilapia aurea*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 39(9): 1597-601, 1991b.

JONES, H.R. Pollution control in meat, poultry and seafood processing, New Jersey, Noyes, 1974. p.215-46.

KARMAS, E. & LAUBIER, E. Novel products from underutilized fish using combined processing technology. *Journal of Food Science*, Champaign, 52(1): 7-9, Jan./Feb. 1987.

KOMPIANG, I.P. Fish silage, its prospect and future in Indonesia. *Indonesian Agricultural Research & Development Journal*, Jackarta, 3(1): 9-12, 1981.

LAJOLO, F.M. Avaliação biológica de produtos obtidos por bioconversão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 18(2): 153-9, abr./jun. 1982.

LAUBIER, L. Aquaculture: biological aspects and economic considerations. In: *NESTLÉ RESEARCH NEWS*. 1978/79. Lausanne, Nestlé Products Technical Assitance, 1979.

LEVIN, R.E. & WITKOWSKI, R. Characteristics and identity of obligately aerobic spoilage yeast from fish silage. *Journal Applied Bacteriology*, Reading, 7(4): 354-9, 1991.

LISTON, J. Avanços na tecnologia de pescados para melhor aproveitamento de espécies industrializadas de baixo valor comercial. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 53: 1-20, 1977.

MAHARAJ, V. & RECKSIEK, C. The by-catch from the artesanal shrimps trawl fishery, Gulf of Paria, Trinidad. *Marine Fisheries Review*, Washington, 53(2): 9-15, Mar./Apr. 1991.

MARTIN, A.M. & PORTER, D. The use of proteolytic enzymes in the production of fish protein concentrates. s.n.t.

MEINKE, W.M. & MATTIL, K.F. Autolysis is a factor in the production of protein isolates from whole fish. *Journal of Food Science*, Champaign, 38: 864-66, 1973.

MEZINCESCU, M.D. & SZABO, F. Method for the determination of the non-protein of tissue. *Journal Biological Chemistry*, 115, 1936.

MORAIS, C. & MARTINS, J. Considerações sobre o aproveitamento de sobras da industrialização de pescado na elaboração de produtos alimentícios. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 18(3): 253-81, 1981.

NUNES, M.L. Resíduos de pescado: aproveitamento sob a forma de silagem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 13., São Paulo, 1992. **Anais**. São Paulo, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1992. p.137.

OETTERER, M. **Matérias primas alimentares; pescado**. São Caetano do Sul, Centro de Pesquisas, 1991. 30p.

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, 1992. **Anais**. São Paulo, SBCTA, 1992. p.140.

OTTATI, M.; GUTIERREZ, M.; BELLO, R.A. Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de especies subutilizadas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Guatemala, 40(3): 411-25, July, 1990.

PAN, B.S. Recovery of shrimp waste for flavourant. In: Atlantic Fishery Technology Conference Seafood Biotechnology Workshop, 34., St. John's, 1989. Papers. Lancaster, Technomic, 1989. p.437-52.

RAA, M.E.J. & GILBERT, A. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. *Journal of Food Technology*, Oxford, 11(6):619-28, 1976.

RAGHUNATH, M.R. & McCURDY, A.R. Autolysis-resistance sediment in fish silage. *Biological Wastes*, Barking, 20(3): 227-39, 1987.

REBECA, B.D.; PENA-VERA, M.T.; DIAS CASTANERA, M. Production of fish protein hidrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *Journal of Food Science*, Champaign, 56(2): 2309-14, 1991.

REGENSTEIN, J.M. Fish waste: resource recovery workshop. *IFT*, Blacksburg, 8(2):5-6, Mar. 1990.

REUNIÃO da Comissão de Energia e Meio Ambiente. São Paulo, 1992. *Pró-memória*. São Paulo, ABIA, 1992. 4p.

RODRIGUEZ, T.; MONTILLA, J.J.; BELLO, R.A. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camaron. I - Elaboracion y evaluacion biologica. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, Guatemala, 40(4): 427-37, Sep., 1990a.

RODRIGUEZ, T.; MONTILLA, J.J.; BELLO, R.A. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camaron. II - Prueba de comportamiento em polla de engorda. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, Guatemala, 40(4):548-59, Sep. 1990b.

ROLLER, S. & SWINTON, S. Enzymes and the food industry: the role of the Leatherhead Food Reserch Association. Food Science and Technology Today, London, 4(2): 11-4, Mar. 1990.

SALES, A.M.; CARVALHO, A.C.V.; BALDINI, V.L.S.; GONÇALVES, J.R.; BERAQUET, N.J. Extração enzimica de proteína de residuo de carne de frango mecanicamente separada. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 21(2): 233-42, jul./dez. 1991.

SALES, R.O.; OLIVEIRA, A.C.; GUIMARÃES, J.G.L. Elaboração de autolisado ácido (silagem) de tilápia (*Sarotherodon niloticus*) e acompanhamento do processo de autólise. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 13., São Paulo, 1992. Anais. São Paulo, SBCTA, 1992. p.130.

SANKAR, T.V. & SOLANKI, K.K. Changes in nitrogen fractions in the fillets of elasmobranchs during salting. *Fishery Technology*, Cochin, 29(1): 47-7, Jul. 1992.

SEAL, K.J. Animal wastes as source of biomass production. *Outlook on Agriculture*, Bracknell, 21(2): 91-7, 1992.

SHOEMAKER, S. The use of enzymes for waste management in food industry. In: HARLANDER, S.K. & LABUZA, T.P. *Biotechnology in food processing*, New Jersey, Noyes Publ., 1986. p.259-69.

SMALL-Scale fish composting trials. *BioCycle Journal of Waste Recycling*, Emmaus, 33(2):62, Feb. 1992.

SPENCER, R. Food waste composting in Canada. *BioCycle Journal of Waste Recycling*, Emmaus, 31(6): 30-2, Jun. 1990.

SPIES, J.R. Colorimetric procedures for amino acids. *Methods in Enzymology*, New York, 3: 468-71, 1957.

STABILE, M.N. & BARUFFALDI, R. Solubilidade e grau de hidrólise da carne bovina tratada por enzimas. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, São Paulo, 27(2): 184-97, jul./dez. 1991.

STONE, F.E. & HARDY, R.W. Nutritional value acid stabilized silage and liquefied fish protein. *Journal of Science and Agriculture*, London, 37: 797-803, 1986.

STROM, T.; GILBERT, A.; STORNO, B.; RAA, J. Fish silage: why not use propionic and formic acid? *Advances Fish Science Technology*, 352-5, 1979.

STROM, T. & EGGUM, B.O. Nutritional value of fish viscera silage. *Journal of Science Food and Agriculture*, London, 32:115-20, 1981.

TATTERSON, J.N. & WINDSOR, M.L. Fish silage. Aberdeen, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food/Torry Research Station, s.d. 6p. (Torry Advisory Note, 64).

TATTERSON, J.N. & WINDSOR, M.L. Fish silage. *Journal of Science Food and Agriculture*, London, 25:369-79, 1974.

TENUTA FILHO, A. Caracterização nutricional e funcional da proteína recuperada de cefalotótax de camarão rosa e estudo do aproveitamento do produto residual. São Paulo, 1983. 79p. (Doutoramento - Faculdade de Farmácia e Bioquímica / USP).

UNITED NATION INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION. - UNIDO
Environmental management in fishery-based industries.
1991. 88p. (Working Papers in Industrial Planning, 5).

VIEIRA. R.H.S.F.; VIEIRA, G.H.F.; ROCHA, C.A.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A.H. Estudo organoléptico e bacteriológico de caudas de lagosta estocadas em gelo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 13., São Paulo, 1992. Anais, São Paulo, SBCTA. 1992. p.130.

WINDSOR, M.L. Production of liquid fish silage for animal feed. In: KREUZER, R. Fishery products. London, FAO/Fishing News, 1979, p.140-4.

WRAY, T. Fish processing: new uses for enzymes. Food Manufacture, London, 249: 48-9, Jul. 1988