

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

LIGIANNE DIN SHIRAHIGUE VIANI

**Fracionamento e seletividade, visando otimização, de coprodutos
provenientes do resíduo do processamento de pescado**

Piracicaba

2014

LIGIANNE DIN SHIRAHIGUE VIANI

**Fracionamento e seletividade, visando otimização, de coprodutos
provenientes do resíduo do processamento de pescado
Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear
na Agricultura da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

Orientadora: Profa. Dra. Marília Oetterer

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Viani, Ligianne Din Shirahigue

Fracionamento e seletividade, visando otimização, de coprodutos provenientes do resíduo do processamento de pescado / Ligianne Din Shirahigue Viani; orientadora Marília Oetterer. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

160 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Alimentos de origem animal 2. Análise de alimentos 3. Centrifugação
4. Hidrólise 5. Processamento de alimentos 6. Resíduos sólidos
7. Tilápia-do-Nilo I. Título

CDU 639.38 : 664.957

**A minha pequena Alice por tudo que me ensinou
desde a sua existência.**

DEDICO

**A meu querido esposo Ricardo, por todo carinho
e amor.**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À Profa. Dra. Marília Oetterer pela orientação, pela confiança, por toda dedicação e amizade.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela excelência em minha formação na área da Pesquisa.

Ao meu querido esposo Ricardo, por sempre estar ao meu lado, me incentivando e apoiando em todos os momentos e por ser tão dedicado e companheiro.

A minha doce Alice, que me ensinou o que é o amor incondicional, me faz a pessoa mais feliz do mundo.

À minha família, meu pai José Kenji e minha mãe Maria Helena pelo exemplo de dedicação, força e honestidade e principalmente pelo amor e carinho. Às minhas queridas irmãs Annelise e Tatianne pelo amor, confiança, cumplicidade ou simplesmente pelo fato de fazerem parte de minha vida. Aos meus cunhados Sandro, Arthur, Paula, José Carlos e Renato pela amizade. As minhas lindas sobrinhas Manuela e Chiara.

Ao Laboratório de Pescado e ao grupo GETEP, especialmente a Juliana, Luciana, Aline Camargo, Aline Gomes, Amanda, Camila, Iris, Maira, Taciana e Eddie por todo auxílio e dedicação no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade.

Aos Profs. Carmen Josefina Contreras Castillo, Severino Matias de Alencar, Marisa Aparecida Bismara Regitano d’Arce, Cláudio Rosa Gallo e Thais Maria Ferreira de Souza Vieira pela atenção e direcionamento em todas as etapas do meu Doutorado.

Aos Laboratórios de Qualidade de Carnes, Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Óleos e Gorduras e Microbiologia de Alimentos por toda ajuda e pela disponibilidade dos equipamentos e estrutura para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Às amigas da Lia, Lika e Ingridy, pela amizade, dedicação e companheirismo. Mesmo distante guardo vocês em meu coração.

Aos funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura e do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, por todo apoio e paciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudo concedida.

E, por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

SHIRAHIGUE, L. D. **Fracionamento e seletividade, visando otimização, de coprodutos provenientes do resíduo do processamento de pescado.** 2014. 160 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Os nutrientes e os compostos bioativos do pescado são de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica. Estes compostos podem estar presentes na fração lipídica e proteica de espécies de peixe, crustáceos, algas e microalgas utilizadas para consumo humano, e também, no material descartado como resíduo do processamento. Elaboraram-se coprodutos utilizando resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e beijupirá (*Rachycentron canadum*), a fim de investigar diferentes formas de aproveitamento destes, buscando agregar valor ao material que seria descartado ou subutilizado. Num primeiro estudo, foram observadas as condições eficientes de hidrólise para o resíduo do processamento de tilápia utilizando diferentes enzimas, e estabelecendo os períodos de hidrólise que propiciassem melhor qualidade da fração lipídica. Posteriormente, elaborou-se silagem química com resíduo da mesma espécie, para caracterização desta e avaliação da estabilidade microbiológica. Consequente, fez-se um estudo com os resíduos das duas espécies para elaboração das silagens a fim de verificar a qualidade das frações e seus melhores rendimentos, ao longo do tempo de estocagem. E por fim, foi realizado um estudo para elaborar e verificar a viabilidade de produção do coproduto peptona, obtido a partir da fração aquosa destas silagens. Os tratamentos testados se mostraram viáveis para obtenção de hidrolisado proteico, sendo que o tipo de enzima e o tempo de hidrólise determinaram o grau de fracionamento. A fração lipídica apresentou quantidade relevante de ácidos graxos poli-insaturados e adequada relação n-6/n-3. Para os testes com silagem de tilápia, a estabilidade foi satisfatória ao longo de 40 dias de armazenamento em temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$. Quanto às silagens elaboradas, com ambas as espécies, observou-se que os tratamentos nos quais não foram adicionados BHT, os valores para o Índice de Peróxidos foram elevados, indicando que houve um processo de degradação da fração lipídica presente nas silagens e reafirmando a necessidade de se utilizar um antioxidante nas formulações. Houve também um aumento gradual no Nitrogênio não proteico durante a hidrólise, ascendendo de forma significativa entre os tempos de armazenamento. Em relação ao rendimento, as silagens demonstraram melhores rendimentos das frações aquosas no período de 10 e 20 dias de estocagem. Para a composição de ácidos graxos, tanto para os resíduos, quanto para as silagens observou-se que o ácido oleico (18:1) apresentou-se em maior quantidade nas frações analisadas. A fração aquosa das silagens tanto de tilápia, quanto de beijupirá, apresentou teores mais elevados de ácido glutâmico, lisina, glicina e ácido aspártico. Estas frações mostraram-se efetivas no crescimento dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, podendo ser convertidas em peptonas por um processo de fracionamento e liofilização. Os resultados obtidos indicam que é possível produzir um coproduto de pescado com valor agregado, colaborando para a sustentabilidade da cadeia produtiva destas espécies, desde que haja o procedimento de coleta seletiva para a separação dos resíduos gerados nas unidades processadoras.

Palavras-chave: Resíduo de pescado. Silagem. Sustentabilidade. Coprodutos. Hidrólise Química. Peptídeos. Ácidos graxos. Tilápia. Beijupirá.

ABSTRACT

SHIRAHIGUE, L. D. **Fractioning and selectivity aiming optimization of byproducts obtained from the processing waste of fish species.** 2014. 160 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Fish have chemical and nutritional compounds of interest for pharmaceutical and food industries. Those compounds may be found in the lipid and/or protein fraction of fish, crustaceans, algae and microalgae used for human consumption, and also in the fish material discarded as processing residue. We prepared byproducts using “tilapia” (*Oreochromis niloticus*) and “beijupirá” (*Rachycentron canadum*) processing residues aiming to investigate different ways for using them and to aggregate value for the raw material that would be discarded or under-used. In a first study, we analyzed hydrolysis efficient conditions for tilapia processing residues, using different enzymes, aiming to identify the hydrolysis periods which could generate the best quality lipid fractions. Subsequently, we prepared chemical silage with residues from the same fish species for characterization and evaluation of microbiological stability. Thus, we did a silage preparation study with tilapia and beijupirá wastes to verify fractions quality and yield over time of storage. Finally, we did a study to prepare and evaluate the viability of peptone byproduct production from those silages aqueous fractions. The treatments tested showed the viability for protein hydrolyzed production, with enzyme type and hydrolysis time determining the fractioning level. The lipid fraction showed a relevant amount of polyunsaturated fatty acids and appropriated n-6/n-3 relation. In the tilapia silage tests, the stability over the 40 days of storage ($25\pm 1^\circ\text{C}$) was satisfactory. With respect to the silages prepared with both species, we observed that treatments without BHT addition had high peroxide values, indicating that a degradation process occurred in the lipid fraction present in the silages and reaffirming the necessity of using an antioxidant in the formulations. During hydrolysis, there was also a significant increase in non-protein nitrogen over the time of storage. Silages showed the best aqueous fraction yield in the period of 10 and 20 days of storage. Regarding fatty acids composition, we observed that in both wastes and silages, oleic acid (18:1) was found in higher quantities in the fractions analyzed. Silage aqueous fraction of both tilapia and beijupirá had higher levels of glutamic acid, lysine, glycine and aspartic acid. Those fractions showed to be effective for the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* microorganisms, being able to be converted to peptones by a process of fractioning and lyophilization. The results obtained indicate that it is possible to produce a fish byproduct, with aggregated value, collaborating with sustainability of chain, provided that a procedure of selective collection for separation of the wastes generated occurs in the processing units.

Keywords: Waste of fish. Silage. Sustainability. Co-products. Chemical hydrolysis. Peptides. Fatty acids. Tilapia. Beijupirá.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 FRACIONAMENTO E SELETIVIDADE, VISANDO OTIMIZAÇÃO, DE COPRODUTOS PROVENIENTES DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE PESCADO.....	18
Resumo.....	18
Abstract.....	19
2.1 Introdução.....	20
2.2 Desenvolvimento.....	21
2.2.1 Resíduo de pescado.....	21
2.2.2 Hidrolisado proteico.....	23
2.2.2.1 Hidrólise enzimática.....	24
2.2.3 Silagem de pescado.....	26
2.2.3.1 Ácidos empregados na elaboração da silagem.....	27
2.2.4 Coprodutos.....	28
2.2.5 Ingredientes de interesse químico e nutricional do pescado.....	29
2.2.6 Peptonas.....	30
2.2.7 Peptonas de pescado.....	31
2.3 Conclusões.....	33
Referências.....	33
3 VIABILIDADE DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUO DE TILÁPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) NA RECUPERAÇÃO DE LIPÍDEOS E OBTENÇÃO DE COPRODUTOS.....	41
Resumo.....	41
Abstract.....	41
3.1 Introdução.....	42
3.2 Desenvolvimento.....	43
3.2.1 Material.....	43
3.2.2 Obtenção do hidrolisado proteico (HP).....	43
3.3.3 Análise de rendimento.....	45
3.3.4 Extração dos lipídeos.....	45
3.3.5 Preparo dos ésteres metílicos para cromatografia gasosa.....	45

3.3.6 Composição em ácidos graxos.....	46
3.3.7 Análise estatística.....	46
3.3.8 Resultados e Discussão	46
3.3.8.1 Composição centesimal da matéria prima utilizada.....	46
3.3.8.2 Hidrólise enzimática e rendimento das frações	47
3.3.8.3 Perfil de ácidos graxos da fração lipídica	49
3.4 Conclusões	52
Referências.....	53
4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E SELEÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA ELABORAÇÃO DE COPRODUTO A PARTIR DE RESÍDUO DE TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>).	57
Resumo	57
Abstract	58
4.1 Introdução	59
4.2 Desenvolvimento	60
4.2.1 Material	60
4.2.2 Elaboração da Silagem.....	60
4.2.3 Análise de pH e composição centesimal.....	61
4.2.4 Análise Microbiológica.....	61
4.2.5 Fracionamento da silagem química e rendimento das frações.....	61
4.2.6 Avaliação estatística.....	62
4.2.7 Resultados e Discussão	62
4.2.7.1 Elaboração e estabilidade das silagens	62
4.2.7.2 Composição química do resíduo bruto e das silagens	64
4.2.7.3 Avaliação microbiológica	66
4.2.7.4 Rendimento e avaliação visual das frações.....	68
4.3 Conclusões	70
Referências.....	70
5 ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COPRODUTOS DE RESÍDUOS DE TILÁPIAS (<i>Oreochromis niloticus</i>) E BEIJUPIRÁ (<i>Rachycentron canadum</i>).	74
Resumo	74
Abstract	75
5.1 Introdução	76
5.2 Desenvolvimento	77

5.2.1 Matéria-prima.....	77
5.2.2 Elaboração de Silagem química.....	78
5.2.3 Análise do pH e da composição centesimal.....	79
5.2.4 Análise de Índice de peróxido.....	80
5.2.5 Nitrogênio proteico e nitrogênio não proteico.....	80
5.2.6 Fracionamento da silagem química e rendimento das frações.....	80
5.2.7 Composição em ácidos graxos dos resíduos e das frações lipídicas das silagens....	81
5.2.7.1 Esterificação.....	81
5.2.7.2 Composição em ácidos graxos.....	81
5.2.8 Caracterização dos aminoácidos dos resíduos, das silagens e das frações de sedimento das silagens.....	82
5.2.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).....	82
5.2.9 Avaliação estatística.....	82
5.2.10 Resultados e Discussão.....	82
5.2.10.1 Estabilidade do pH das silagens.....	82
5.2.10.2 Composição centesimal do resíduo bruto e das silagens.....	85
5.2.10.3 Análise de Índice de Peróxido.....	88
5.2.10.4 Nitrogênio proteico e nitrogênio não proteico.....	91
5.2.10.5 Caracterização de aminoácidos dos resíduos e das silagens.....	95
5.2.10.6 Rendimento das frações.....	98
5.2.10.7 Caracterização da fração lipídica das silagens.....	100
5.2.10.8 Caracterização do sedimento das silagens.....	102
5.3 Conclusões.....	105
Referências.....	106
6 ELABORAÇÃO DE COPRODUTO PEPTONA OBTIDO VIA FRACIONAMENTO DAS SILAGENS DE DUAS ESPÉCIES DE PESCADO.....	112
Resumo.....	112
Abstract.....	113
6.1 Introdução.....	114
6.2 Desenvolvimento.....	116
6.2.1 Matéria-prima.....	116
6.2.2 Elaboração da silagem química.....	116
6.2.3 Fracionamento da silagem química e liofilização da fração aquosa.....	117
6.2.4 Caracterização dos aminoácidos das frações aquosas.....	118

6.2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR).....	118
6.2.5 Testes de efetividade das peptonas	118
6.2.5.1 Fonte de microrganismos	118
6.2.5.2 Preparação das peptonas	119
6.2.5.3 Detecção do crescimento microbiano por Densidade Ótica – cepas puras.....	119
6.2.5.4 Detecção por Plaqueamento.....	119
6.2.5.5 Produção de biomassa.....	120
6.2.6 Avaliação estatística.....	120
6.2.7 Resultados e Discussão	120
6.2.7.1 Frações aquosas liofilizadas (Peptonas).....	120
6.2.7.2 Caracterização dos aminoácidos das frações aquosas	122
6.2.7.3 Detecção do crescimento microbiano por Densidade Ótica	123
6.2.7.4 Detecção por Plaqueamento.....	128
6.2.7.5 Produção de biomassa.....	130
6.3 Considerações Finais	132
Referências.....	133
7 CONCLUSÕES GERAIS	143
ANEXOS	145

1 INTRODUÇÃO

Os coprodutos de pescado são cada vez mais vistos como um potencial recurso para obtenção de componentes específicos de interesse para a indústria, sendo, no entanto, necessário que sejam disponibilizados e caracterizados. A otimização destes coprodutos, através do fracionamento, seleção e conseqüente verticalização, possibilitará a obtenção de novas matérias-primas diferenciadas para diversos seguimentos industriais.

A produção mundial de pescado, em 2012, foi de 158 milhões de t, sendo que deste total, 66,6 milhões de t foram provenientes da aquicultura e 91,3 milhões de t da pesca ou captura. Do total da produção mundial, 136 milhões de t foram utilizadas como alimento humano e, cerca de 21,7 milhões de t de pescado foram destinados a fins não alimentares, dos quais 75% (15 milhões de t) foram reduzidos à farinha de peixe e óleo; os restantes 5,1 milhões de t foram amplamente utilizados para fins farmacêuticos, produção de alevinos, como iscas e fins ornamentais, entre outros (*Food and Agriculture Organization (FAO, 2014)*).

No passado, os subprodutos da pesca, incluindo os resíduos, eram considerados sem valor comercial, ou como um problema a ser eliminado da forma mais conveniente. Porém, nas últimas décadas, tem havido uma tendência mundial e conscientização sobre os aspectos econômicos, ambientais e sociais da utilização destes subprodutos, a fim de reduzir as perdas nas fases de processamento. Tecnologias de processamentos veem sendo desenvolvidas para garantir a utilização deste material residual, bem como a sua qualidade e seguridade, além de proporcionar diferentes propósitos, incluindo alimentação animal, produtos farmacêuticos, incorporação nos alimentos para *pets*, silagens, fertilizantes e, até mesmo, preparação adequada para seguirem aos aterros sanitários.

O apreciável volume de resíduos gera um problema crucial que interfere na sustentabilidade da cadeia produtiva. Dentre os impactos causados pelos resíduos sólidos de pescado, destacam-se os potenciais efeitos negativos causados pela biodeposição, que se acumula sob e no entorno das áreas de cultivo e o subsequente enriquecimento orgânico do leito, com alterações da comunidade de invertebrados bentônicos frente ao estresse ambiental (CALLISTO; BARBOSA, 1999). Portanto, estudos que priorizem a minimização dos resíduos e sua reciclagem na cadeia produtiva podem servir de suporte para definição de políticas públicas que orientem a expansão do agronegócio do pescado dentro de bases ambientalmente sustentáveis no Brasil.

É premente a necessidade de utilização dos descartes do processamento pela previsão de aumento da atividade de beneficiamento, devido à exigência do mercado. O resíduo de pescado é potencialmente rico em compostos bioativos, amplamente reconhecidos pelas suas propriedades promotoras à saúde e pelas aplicações tecnológicas, representando, portanto, fontes naturais destas substâncias. Se empregada uma tecnologia adequada, este material residual pode ser convertido em produtos comerciais ou matéria-prima para processos secundários (FERRAZ DE ARRUDA; BORGHESI; OETTERER, 2007).

A cadeia produtiva do pescado possui potencial para ocupar um espaço destacado no fornecimento de nutrientes à população mundial. Entretanto, um dos principais gargalos do setor é a falta de destinação dos resíduos gerados no processamento do pescado. Dentre as necessidades do setor está o incremento da organização da cadeia produtiva visando à sustentabilidade e consequente qualidade do pescado, e a implantação de tecnologias para obtenção de coprodutos. Neste sentido, ações específicas de natureza ecológica devem ser propostas com o objetivo de contribuir para a exploração sustentável e racional dos recursos, bem como, para minimizar o impacto adverso que os resíduos gerados por esta atividade produzem no ambiente. A importância de se pesquisar o fracionamento da silagem química está na disponibilização da fração proteica como potencial fonte de compostos de interesse nutricional e na produção de água peptonada para uso como meio de cultura microbiana, bem como, isolar esta fração aquosa, que seria interferente para manutenção da qualidade da fração lipídica, fonte de ácidos graxos. O fracionamento da silagem de pescado permite maior seletividade do processo hidrolítico e, conseqüentemente, maior possibilidade de utilização e investigação das frações obtidas, e ainda a comparação dos coprodutos obtidos com outros produtos do mercado.

Os objetivos desta pesquisa foram investigar componentes de interesse químico e nutricional, a partir dos resíduos de pescado e caracterizá-los como coprodutos de valor agregado, partindo de silagem elaborada com as espécies tilápia (*Oreochromis niloticus*) e beijupirá (*Rachycentron canadum*); padronizar o processo de obtenção da silagem química dos resíduos, avaliando o rendimento das sub-frações e a composição química e nutricional; e elaborar meio de cultura microbiano, peptona, a partir das frações aquosas obtidas no fracionamento das silagens, avaliando a eficiência da peptona bacteriológica de resíduo de pescado, comparando-a com produtos comerciais.

O trabalho foi estruturado em:

1. Introdução Geral
2. Fracionamento e seletividade, visando otimização, de coprodutos provenientes do resíduo do processamento de pescado.
3. Viabilidade da hidrólise enzimática de resíduo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) na recuperação de lipídeos e obtenção de coprodutos.
4. Avaliação da estabilidade e seleção de ácidos orgânicos para elaboração de coproduto a partir de resíduo de tilápias (*Oreochromis niloticus*).
5. Elaboração e caracterização de coprodutos de resíduos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e beijupirá (*Rachycentron canadum*).
6. Elaboração de coproduto peptona obtido via fracionamento das silagens de duas espécies de pescado.
7. Conclusões Gerais

2 FRACIONAMENTO E SELETIVIDADE, VISANDO OTIMIZAÇÃO, DE COPRODUTOS PROVENIENTES DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE PESCADO

Resumo

A cadeia produtiva do pescado possui potencial para ocupar um espaço destacado no fornecimento de nutrientes à população mundial. Entretanto, um dos principais gargalos do setor é a falta de destinação dos resíduos gerados no processamento do pescado. Dentre as necessidades do setor está o incremento da organização da cadeia produtiva visando à sustentabilidade e conseqüente, qualidade do pescado e a implantação de tecnologias para obtenção de coprodutos. Neste sentido, ações específicas de natureza ecológica devem ser propostas com o objetivo de contribuir para a exploração sustentável e racional dos recursos, bem como para minimizar o impacto adverso que os resíduos gerados por esta atividade produzem no ambiente. Muito esforço via pesquisas aplicadas, tem sido feito, desde 1990, pela equipe da ESALQ-USP, no sentido de dispor ao produtor sugestões para utilização do resíduo do processamento na forma de coprodutos. A caracterização e a aplicação da silagem de pescado como fertilizante e ração continuam sendo estudados. A importância de se pesquisar o fracionamento da silagem química está na disponibilização da fração proteica como potencial fonte de compostos de interesse nutricional e na produção de água peptonada para uso como meio de cultura microbiana, bem como, isolar esta fração aquosa, que seria interferente para manutenção da qualidade da fração lipídica, fonte de ácidos graxos. O fracionamento da silagem de pescado permitirá maior seletividade do processo hidrolítico e, conseqüentemente, maior possibilidade de utilização e investigação das frações obtidas, e ainda a comparação dos coprodutos obtidos com outros produtos do mercado. Buscou-se, aprimorar as pesquisas que já vem sendo conduzidas, através da verticalização do resíduo, visando promover o aproveitamento da fração proteica para destinos “nobres” no mercado como, por exemplo, a água peptonada utilizada como meio de cultura em análises microbiológicas.

Palavras-chave: resíduo de pescado; silagem; coprodutos; tilápia; beijupirá.

Fractioning and selectivity aiming optimization of byproducts obtained from the processing residue of fish species

Abstract

The fish productive chain has the potential to reach a prominent position in the provision of nutrients for the world population. However, one of the main bottlenecks of this sector is the absence of destination for the wastes generated in the fish processing. One of the sector necessities is the better organization of the productive chain aiming the sustainability and, consequently, fish quality and technology implementation for byproducts obtaining. Therefore, specific actions of ecological nature have to be proposed with the objective of contributing for sustainable and rational use of resources, as well as to minimize the adverse impact that the residues generated by the fish productive chain has in the environment. A lot of efforts through applied research have been done since 1990 by the ESALQ-USP team to provide to fish producers suggestions for using processing residue as byproducts. Fish silage characterization and application as fertilizers and feed continue to be studied. Studying chemical silage fractioning is important because of the possibility of providing the protein fraction as a potential source of nutritional interest compounds, for peptone water production to be use in microbial culture, and to isolate the aqueous fraction, which would affect the maintenance of the lipid fraction quality as a source of fatty acids. The fish silage fractioning will ensure higher selectivity of the hydrolic process and, consequently, higher use and investigation possibilities of the fractions obtained. In addition, it will ensure the comparison of the byproducts obtained with other products already present in the market. We tried to enhance the researches already being done, by studying waste. Our aim is to promote the destination of the protein fraction for a noble use in the market, such as for peptone water used for microbial culture for microbiological analyses purposes.

Keywords: fish residue; silage; byproduct; tilápia; beijupirá.

2.1 Introdução

A produção brasileira de pescado aumentou 25% no período de 2002 a 2010, passando de 990.899 t para 1.240.813 t. No mesmo período, a aquicultura apresentou uma elevação de 43,8%, de 289.050 t para 415.649 t, enquanto que, a produção da pesca extrativa obteve um aumento de 5,4%, de 783.176 t para 825.164 t (BRASIL, 2010).

A tilápia (*Oreochromis* sp.) é o segundo pescado mais produzido no mundo, com produção estimada em aproximadamente 3,5 milhões de toneladas (FAO, 2012). Introduzida no Brasil em 1971, apresentou produção de 155,4 mil t em 2010, com crescimento de 139,8% quando comparada à produção de 2003 (64,8 mil t), representando 39,4% do total de pescado proveniente da piscicultura continental (394,3 mil t), sendo assim a espécie de pescado de água doce mais cultivada no Brasil (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA, 2012).

Dentre as espécies nativas com potencial para cultivo marinho em nosso país, destaca-se o beijupirá (*Rachycentron canadum*) (CAVALLI; HAMILTON, 2007). Essa espécie distribui-se na maior parte do litoral brasileiro, sendo encontrada em águas tropicais e subtropicais de todos os continentes (SHAFFER; NAKAMURA, 1989; BROWN-PETERSON et al., 2000).

A elaboração de coprodutos advindos do processamento destas espécies e o uso de material subutilizado são alternativas para resolver a escassez de produtos de origem proteica, além de promover a redução do volume de resíduos sólidos oriundos do processamento de pescado, minimizando um problema ambiental. Entre as técnicas disponíveis para aproveitamento do resíduo de pescado, a obtenção da silagem de pescado surge como tecnologia promissora, devido à sua qualidade nutricional, proporcionada pelos aminoácidos presentes, facilidade de elaboração e custo reduzido.

Esta revisão procurou trazer informações sobre os resíduos de pescado e a elaboração de coprodutos, suas características em termos de processo, estabilidade e valor nutricional, assim como, direcionar estes resíduos para elaboração de coprodutos, como a peptona.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Resíduo de pescado

A crescente preocupação com o meio ambiente e a sustentabilidade do planeta gera cobranças em todos os setores, para que seja aplicada uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. O termo resíduo é utilizado não somente para descartes sólidos, mas também para efluentes líquidos e para o material presente nas emissões atmosféricas; refere-se também às sobras e aos subprodutos do processamento dos alimentos, pois diferentemente do lixo, esses resíduos possuem valor econômico agregado pelo fato de possibilitarem o reaproveitamento na própria cadeia de produção e consumo (NOLASCO, 2000; PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007; TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000).

No setor agroindustrial, as indústrias têm direcionado seus esforços para o desenvolvimento de soluções que tornem o processamento mais efetivo, como a prevenção da geração do resíduo, a minimização e a reciclagem dos resíduos industriais. Soluções que possam servir de suporte para definição de políticas públicas que orientem a expansão do agronegócio dentro de bases ambientalmente sustentáveis (JUSKAITÈ-NORBUTIENÈ; MILIUTÈ; CESNAITIS, 2007). O aproveitamento das sobras comestíveis geradas no processamento pode minimizar o problema da poluição ambiental e diminuir os custos dos insumos e, até mesmo, da matéria-prima em questão; em contrapartida o gerenciamento inadequado do material residual tem influência direta sobre a sustentabilidade da cadeia produtiva, diminuindo a lucratividade da indústria (BENITES, 2003; CATCHPOLE; GRAY, 2010).

Algumas empresas adotaram o conceito de “Produção Mais Limpa” e estão em busca do controle dos efeitos ambientais de todo o processo de produção, desde a escolha da matéria-prima até o destino final do produto e dos resíduos (EPELBAUM, 2004), tendo em vista uma forma mais racional de recuperação e/ou destino diante do potencial agroindustrial (ANBE, 2011).

Os resíduos do processamento de pescado eram considerados como lixo e descartados, sem tentativas de recuperação, representando sérios problemas de poluição ambiental pela falta de destino adequado a este material, sendo este resíduo composto por vísceras, peles, escamas, ossos e tecido muscular, podendo representar até 70% da matéria-prima original (RAMÍREZ, 2007). Mundialmente os resíduos de pescado oscilam entre

18 a 30 milhões de t, considerando não apenas, aquele que é descartado pela indústria, mas, também, o que é perdido mesmo antes de chegar às plantas processadoras devido ao manejo, transporte e armazenamento inadequados praticados durante e após a captura (ZAHAR et al., 2002).

É de grande relevância utilizar a matéria-prima em toda a sua extensão para obtenção de coprodutos, evitando a própria formação do resíduo. Quando o resíduo é gerado deve-se planejar o seu aproveitamento, com o intuito de evitar desperdícios, reduzir os custos de produção e a poluição ambiental, pois com a criação de alternativas tecnológicas, teremos como resultado o desenvolvimento sustentável (ANBE, 2011; ESPINDOLA-FILHO, 1997).

Grande parte da tecnologia utilizada para aproveitamento dos resíduos das indústrias de pescado não se mostra economicamente atrativa, em vista do elevado investimento inicial, todavia, uma alternativa viável seria destinar o resíduo, à fabricação da silagem de pescado, por ser um produto de fácil elaboração e que não exige alto investimento, além de apresentar nutrientes de utilidade para a alimentação animal (BORGHESI et al., 2008). Entretanto, para a utilização deste resíduo na obtenção de um novo produto ou para outras finalidades, este deve estar em conformidade com os requisitos estabelecidos pelos órgãos responsáveis pela liberação do produto (RIBEIRO et al., 2004).

O aproveitamento desse tipo de matéria-prima é considerado como um potencial para elaboração de coprodutos, devido à elevada quantidade de proteínas, enzimas e ácidos graxos presentes em um material de baixo custo (ANBE, 2011; OETTERER et al., 2003). Podem ser obtidos diversos produtos, como o couro (SOUZA, 2004), a farinha (BOSCOLO, 2003), a silagem ou o óleo de peixe (FERRAZ DE ARRUDA, 2004), os quais podem ser utilizados como alimentos alternativos na nutrição animal (BORGHESI; FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2007; FERRAZ DE ARRUDA et al., 2009), buscando a produção de rações de baixo custo e de qualidade nutricional, além de proporcionar aos animais desempenho equivalente àqueles obtidos com o uso de formulados convencionais (OLIVEIRA et al., 2006).

Conforme Martins, Costa e Prentice-Hernández (2009), o resíduo de pescado, que geralmente é utilizado para produzir farinha, poderia ser também utilizado para a elaboração de um produto com maior valor agregado, como por exemplo, o biodiesel, a partir de óleo de resíduo da industrialização do pescado; pode ser uma fonte de energia interessante, visto que sua obtenção se dá a partir de fontes totalmente renováveis, com a produção de menor quantidade de poluentes que os derivados do petróleo (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

2.2.2 Hidrolisado proteico

Os hidrolisados proteicos de pescado podem ser obtidos por meio de três processos – enzimático, químico ou por enzimas endógenas presentes no próprio organismo (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009; SILVA, 2010). Na hidrólise de pescado ocorre a clivagem das proteínas em peptídeos de diferentes tamanhos e em aminoácidos livres, permitindo o isolamento destes constituintes (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009).

A obtenção pela forma química pode ser via hidrólise alcalina ou ácida. A hidrólise ácida consiste na aplicação de ácidos orgânicos, inorgânicos ou a mistura deles, sendo o ácido clorídrico e sulfúrico os ácidos inorgânicos mais aplicados nas indústrias alimentícias. No entanto, apesar da vantagem do baixo custo, o uso destes ácidos implica na aplicação da neutralização dos produtos antes de seu consumo, sendo que este processo origina sais, que podem tornar os produtos não palatáveis e podem afetar a funcionalidade do triptofano (FURLAN; OETTERER, 2002; SILVA, 2010).

A hidrólise alcalina consiste no emprego de soluções de bases fortes, como NaOH e KOH, sob condições de aquecimento e agitação, originando produtos com funcionalidade reduzida e valor nutritivo afetado (SILVA, 2010).

A hidrólise por enzimas proteolíticas específicas é um método alternativo, o qual apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise química, como a especificidade em ligações peptídicas, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação e o menor conteúdo de sal no hidrolisado final. Além disso, como a quantidade de enzima aplicada é reduzida, sua remoção é desnecessária (ZAVAREZE et al., 2009). Furlan e Oetterer (2002) ainda conferem ao processo de hidrólise enzimática a característica de ser mais simples e rápido.

Várias pesquisas têm sido realizadas em relação à avaliação das condições de hidrólise e às propriedades funcionais do hidrolisado proteico (SANTOS et al., 2009). De modo geral, a hidrólise é um processo com boa eficiência no requisito solubilidade das proteínas do pescado, sendo que a produção de proteínas com boa solubilidade depende de alguns fatores como reagentes químicos, tipo de enzima, substrato, temperatura, pH, tempo de incubação e concentração da enzima (CENTENARO; PRENTICE-HERNÁNDEZ; SALAS-MELLADO, 2009; MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009).

Os hidrolisados proteicos podem ser obtidos de pescado com baixo valor comercial ou por meio dos resíduos gerados durante as etapas de processamento. O resíduo ideal como matéria-prima para a obtenção de hidrolisados é aquele oriundo de pescado magro, pois quando o teor de gordura é elevado pode haver geração de aromas intensos no produto elaborado (ZAVAREZE et al., 2009). Segundo Furlan e Oetterer (2002) não há espécies de pescado mais apropriadas à hidrólise; a escolha dependerá da disponibilidade do fabricante e das especificações exigidas pelo cliente.

Na literatura há artigos que se referem a várias espécies como arenque, tubarão, salmão, *capelin*, sardinha, corvina, bacalhau, tilápia e lula (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005; BATISTA et al., 2009; CENTENARO; PRENTICE-HERNÁNDEZ; SALAS-MELLADO, 2009; KLOMPONG et al., 2007; MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009; SILVA, 2010). Sendo que algumas das pesquisas confirmaram que a inclusão de hidrolisado proteico de peixe em até 60% em dietas para pescado ou teores entre 19 e 24% em substituição à farinha de peixe são potencialmente favoráveis ao cultivo das espécies aquáticas, no entanto, os teores aplicados ou substituintes da farinha de pescado devem ser adequados, pois concentrações elevadas podem interferir de forma negativa no crescimento e utilização de nutrientes (BUENO, 2006).

2.2.2.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de pescado consiste em um método de recuperação de proteínas de espécies subutilizadas ou de resíduos de processamento, considerados descartes devido ao baixo valor comercial, sendo a recuperação obtida pelo uso de enzimas proteolíticas, as quais permitem a solubilização proteica do pescado (FURLAN; OETTERER, 2002).

Na preparação de hidrolisados proteicos, estes passam pelo processo de centrifugação, resultando em três fases distintas: semissólida ou fase insolúvel; fase líquida ou fase solúvel e a fração superior, sobrenadante, que contém os lipídeos (CHO et al., 2008).

Na fração solúvel estão presentes as proteínas, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres, podendo ser aplicada na alimentação humana na forma de ingredientes ou coprodutos, após desidratação (BOMBARDELLI; SYPERRECK; SANCHES, 2005). O teor de proteínas presente nesta fração pode ser em torno de 90%. Os sólidos solúveis da fração podem sofrer desidratação a vácuo, até atingirem cerca de 50% de umidade e, posteriormente, por nebulização, até 4%. A fração insolúvel possui em sua composição proteínas não

hidrolisadas e outros compostos não solúveis, podendo ser aplicada à alimentação animal (FURLAN; OETTERER, 2002; SILVA, 2010).

Segundo Silva (2010) o hidrolisado proteico de pescado pode ser obtido por dois métodos enzimáticos: adição de enzimas comerciais e autólise enzimática. Apesar de a autólise ser uma técnica mais comum e econômica, por utilizar as enzimas das próprias vísceras, a utilização de enzimas comerciais permite que haja um maior controle do processo, devido à especificidade de ação das proteases em dada espécie de peixe, o que pode ser diferente entre as espécies.

O uso de enzimas no processo de hidrólise proteica permite um melhor controle do grau de clivagem das proteínas no substrato, por meio da desativação enzimática pelo aquecimento, com controle das proporções adequadas de enzima/substrato e do tempo de reação ideal para que haja a produção de hidrolisados com distintas estruturas moleculares, bem como, obtenção de distintas propriedades funcionais, podendo ser aplicadas em formulações alimentícias (SANTOS et al., 2009).

Segundo Furlan e Oetterer (2002) a ação proteolítica enzimática é acelerada com o controle do pH, da temperatura, do tempo e de outros fatores durante o processo, por exemplo, o aumento do tempo promove uma maior quebra e diminuição do comprimento médio da cadeia de peptídeos na fração solúvel, assim como a relação enzima/substrato. No entanto, o tempo de proteólise deve ser controlado, não podendo ocorrer em excesso, a fim de não formar peptídeos muito solúveis com características funcionais inadequadas, os quais podem conferir sabor amargo ao pescado (ZAVAREZE et al., 2009).

Geralmente, soluções ácidas ou alcalinas são aplicadas no processo de hidrólise a fim de promover melhores condições de digestão proteica ou até mesmo para prevenir o desenvolvimento e crescimento de bactérias no meio. Quando há ajuste do pH, o processo de digestão pode ocorrer durante 15 minutos a 25-70°C, sendo que em temperaturas superiores a 45°C e valores de pH extremos, pode se controlar o desenvolvimento de bactérias indesejáveis (FURLAN; OETTERER, 2002).

Como o hidrolisado proteico de pescado tem forma líquida, é preciso desidratá-lo a fim de facilitar o seu uso na indústria, principalmente, na ração animal, sendo o *Spray-Dryer* um dos equipamentos mais utilizados na indústria, por ser mais fácil a sua manipulação e possuir maior estabilidade. No entanto, a temperatura utilizada neste equipamento pode influir na qualidade do hidrolisado proteico, como o teor proteico, a umidade e o teor dos aminoácidos essenciais, exceto a metionina (SILVA, 2010).

2.2.3 Silagem de pescado

A ensilagem de resíduos de pescado é uma técnica de conservação da matéria orgânica, na qual a preservação pode ser feita quimicamente, através da acidificação direta utilizando ácidos orgânicos e/ou minerais, biologicamente, sendo a acidificação realizada por micro-organismos produtores de ácido lático ou pela combinação dos dois métodos. Ao final do processo é obtido um produto líquido, sendo hoje esta tecnologia considerada útil para resolver os problemas do volume crescente de resíduos do setor pesqueiro, e torna-se vantajosa, pois necessitam apenas de triturador, agitador e recipientes inoxidáveis (silos) e não exige mão-de-obra especializada (CARNEIRO, 2003; FERRAZ DE ARRUDA; BORGHESI; OETTERER, 2007; KOMPIANG, 1981; RAI et al., 2010; TATTERSON; WINDSOR, 1974; VIDOTTI; VIEGAS; CARNEIRO, 2003).

A silagem química de pescado é uma forma de hidrolisado ácido e apresenta-se como alternativa pouco onerosa para o aproveitamento de resíduos, por não empregar equipamentos caros e grandes custos energéticos. Os principais interferentes na manutenção da qualidade da silagem são a oxidação lipídica e a logística de distribuição deste material volumoso e de umidade elevada (BORGHESI et al., 2008; FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2005; FERRAZ DE ARRUDA et al., 2006; FERRAZ DE ARRUDA; BORGHESI; OETTERER, 2007). A separação e retirada das frações lipídica e aquosa, deverá aumentar a estabilidade dos coprodutos; ao promover a diminuição da umidade do material, há aumento da possibilidade de utilização da fração proteica.

De acordo com Anbe (2011), a fração aquosa de silagem de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), elaborada com ácido cítrico, pode ser considerada uma peptona em potencial devido à presença de todos os aminoácidos essenciais, contudo, é necessário que seja testada como meio de cultura microbiano. A Figura 2.1 apresenta o fluxograma de obtenção da silagem.

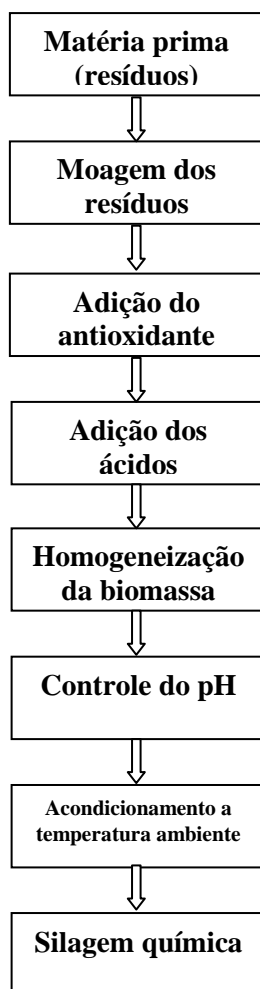


Figura 2.1. Etapas do processo de produção da silagem química

2.2.3.1 Ácidos empregados na elaboração da silagem

Na produção da silagem, a hidrólise ácida pode ser realizada com uso de ácidos inorgânicos, orgânicos ou por uma mistura de ambos. Os ácidos inorgânicos, como o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico, embora de baixo custo, têm a desvantagem de necessitar de neutralização (FURLAN, OETTERER, 2002). Este processo resulta em uma considerável quantidade de sal nos produtos, o que pode tornar o produto não palatável e interferir na sua funcionalidade (ANBE, 2011).

Porém, sabe-se que na silagem de pescado, a acidificação do meio garante a conservação do material, evitando a putrefação bacteriológica (CARMO et al., 2008). Dessa forma, a seleção do agente acidificante interfere no desempenho, na liberação de peptídeos e nos custos da silagem elaborada. Para que este coproduto seja realmente sustentável, a seleção

do agente acidificante deve ser baseada no custo, disponibilidade, ação bactericida, periculosidade do ácido ao ambiente e à saúde humana (SUCASAS, 2011).

Várias pesquisas apontam a utilização da solução de ácido fórmico e ácido propiônico para elaboração da silagem química de pescado. Esta solução combina a presença de ácido orgânico e ácido inorgânico e não propicia pH acentuadamente baixo, uma vez que, o uso apenas de ácidos inorgânicos reduz o pH para cerca de 2, necessitando de uma neutralização posterior à hidrólise (ANBE, 2011).

O ácido propiônico em concentrações de 0,2% inibe o crescimento de fungos. Se utilizados apenas ácidos inorgânicos, o pH deve ser mantido em torno de 2 para evitar a ação bacteriana (VIDOTTI; VIEGAS; CARNEIRO, 2003). Com a utilização de ácidos orgânicos, que possuem propriedades antibacterianas, o pH deverá estar entre 4 e 4,5.

2.2.4 Coprodutos

A utilização de coprodutos advindos do processamento de pescado e o uso de espécies subutilizadas são alternativas para resolver a escassez de produtos de origem proteica, além de aperfeiçoar a redução do volume de resíduos sólidos, oriundos do processamento de pescado, minimizando o impacto ambiental (SILVA; LANDELL-FILHO, 2003).

O uso de tecnologias que visam explorar o valor nutricional desses resíduos e assim desenvolver produtos para alimentação humana, aumenta a capacidade da indústria da pesca para responder, não só à demanda por produtos diferenciados, mas também à tendência da busca por alimentos com alto valor nutritivo, suprimindo as necessidades nutricionais – em especial de proteínas animais, dos setores mais carentes da população, por um preço acessível (MIRANDA et al., 2003).

A industrialização do pescado gera uma quantidade expressiva de resíduos. Estes, por sua vez, apresentam uma composição rica em compostos orgânicos e inorgânicos, como a presença de nutrientes tais quais as proteínas e ácidos graxos de cadeia longa, destacando-se os insaturados da série ômega-3 (BANCO DO NORDESTE, 1999; SEIBEL; SOARES, 2003; SILVA; CAMARGO, 2002).

Para aproveitamento desta fonte de nutrientes, alternativas tecnológicas estão disponíveis, visando agregar valor a este material, sob o enfoque da tecnologia limpa. Este material pode ser processado para a obtenção de óleo, farinha ou silagem que, por sua vez, podem ser aplicados na alimentação animal. Os resíduos de peixe podem ser aplicados como

substrato para a produção de proteína texturizada, concentrado proteico, carne mecanicamente separada, surimi, produtos reestruturados e óleo utilizado na alimentação humana (FELTES et al., 2010).

2.2.5 Ingredientes de interesse químico e nutricional do pescado

O pescado apresenta ingredientes funcionais e compostos bioativos, advindos das proteínas e lipídeos, além de polissacarídeos, em algumas espécies, minerais e vitaminas. Neste contexto, existe um potencial para exploração de ingredientes funcionais do pescado marinho, como peptídeos, taurina, ácidos graxos ômega-3, quitina, quitosana, carotenoides e cálcio. Peptídeos isolados de hidrolisados proteicos de pescado têm mostrado interessante bioatividade, como anti-hipertensiva, antitrombótica, imunomoduladora e antioxidante (KIM; MENDIS, 2006). O pescado marinho é considerado uma boa fonte de taurina, aminoácido essencial para o desenvolvimento de mamíferos. Sua molécula contém um grupo ácido sulfônico em substituição ao ácido carboxílico, sendo encontrada em diferentes espécies de pescado, podendo atuar na redução da pressão arterial, na melhora do desempenho cardíaco e na redução dos níveis de colesterol. A taurina e seus derivados foram identificados em diversos organismos de águas profundas, incluindo os bivalves (GORMLEY, 2006; KADAM; PRABHASANKAR, 2010).

A série de ácidos graxos ômega-3 está inserida dentro da classe de macromoléculas dos lipídeos. Sua fórmula estrutural apresenta um número par de átomos de carbono, variando entre 16 a 26 carbonos (CURI et al., 2002; RUXTON et al., 2004; TURATTI, 2000). Estes compostos são denominados a contar do grupo metila (CH_3) localizado na extremidade final da molécula, até a primeira dupla ligação localizada entre os carbonos 3 e 4 (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; RUXTON et al., 2004).

Os principais ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3, sob o aspecto nutricional, são: alfa-linolênico (C 18:3), eicosapentaenoico EPA (C 20:5) e docosaenoico DHA (C 22:6) (JACOBSEN, 2010). Segundo Pimentel, Francki e Gollücke (2005) os ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA são encontrados em peixes que vivem em águas frias, particularmente, e a sua concentração depende da composição do fitoplâncton local.

Segundo Oetterer (1994) a fração aquosa solúvel da silagem deverá ser a mais valiosa, na promoção do coproduto, por conter a maior parte da proteína presente na silagem. Durante a produção da silagem, ocorre basicamente a autólise em condições ácidas, onde as proteínas das vísceras são hidrolisadas gerando produtos solúveis de baixo peso molecular,

formando uma mistura complexa de aminoácidos e peptídeos que podem ser utilizados como fontes de nitrogênio em meios de cultura microbianos (POERNOMO; BUCKLE, 2002).

Para Stone e Hardy (1986), durante a hidrólise que ocorre naturalmente na silagem, a proteólise na pele e nas vísceras é maior, nas 24 horas iniciais, quando as proteínas são hidrolisadas pelas enzimas e o nitrogênio torna-se solúvel.

De acordo com Tatterson e Windson (1974), as células do tecido muscular do pescado contêm pequenas organelas denominadas lisossomas, que possuem em seu interior um grande número de enzimas hidrolíticas, tais como, catepsinas, fosfatases, nucleases, lipases, proteases e collagenases, que têm pH ótimo na faixa ácida. Com o abaixamento do pH e o rompimento das paredes dos lisossomos, ocorre a liberação destas enzimas e inicia-se a hidrólise de proteínas e a liberação de aminoácidos e peptídeos, ocorrendo o fenômeno da autólise (RAA; GILDBERG, 1976).

As frações aquosas das silagens caracterizam-se como sendo ricas em aminoácidos essenciais. Normalmente, entre os aminoácidos essenciais, o triptofano apresenta-se em menor concentração na silagem, como geralmente ocorre nos demais alimentos (ESPE; RAA; NJAA, 1989; STROM; EGGUM, 1981; FERRAZ DE ARRUDA, 2004; FERRAZ DE ARRUDA et al., 2006; VIDOTTI; VIEGAS; CARNEIRO, 2003).

2.2.6 Peptonas

As peptonas são uma das mais importantes fontes de nitrogênio adicionado nos meios de cultura para crescimento de micro-organismos. O nitrogênio é o componente mais oneroso dos substratos para crescimento microbiano e é fornecido, principalmente, a partir de produtos de origem animal, como carnes, órgãos internos e leite, gelatina, caseína e de plantas e leveduras, sob a forma de proteínas de baixo peso molecular (TASKIN; KURBANOGU, 2011).

As peptonas são definidas como hidrolisados de proteínas que são facilmente solúveis em água e não são precipitáveis por calor, por álcalis ou por saturação com sulfato de amônio (VASILEVA-TONKOVA; NUSTOROVA; GUSHTEROVA, 2007). A hidrólise ocorre pela ação de enzimas como a pepsina, enzima produzida a partir do pepsinogênio, cuja ativação depende do abaixamento do pH (DEGUARA; JEUNCEY; AGLUS, 2003). Também podem sofrer ação de outras enzimas, como papaína, pancreatina ou tripsina. As peptonas, na sua forma pura, apresentam textura de pó, de cor branca e levemente amarelada e caracteriza-se por ser solúvel em água.

Peptonas para fins microbiológicos são obtidos a partir de carne bovina, carne de porco e carne de cavalo, porém diversos estudos relatam que a carne de pescado e seu resíduo podem ser fontes para elaboração de peptona de mesma qualidade (JAYATHILAKAN et al., 2012).

Diferentes materiais oriundos de fontes animais e vegetais são utilizados para produção de peptonas, a maioria destes com elevado custo pelo processo de obtenção (DUFOSSE; DE LA BROISSE; GUERARD, 2001; POERNOMO; BUCKLE, 2002; MARTONE; BORLA; SÁNCHEZ, 2005; VASILEVA-TONKOVA; NUSTOROVA; GUSHTEROVA, 2007). Os materiais de origem animal empregados para obtenção deste produto são, muitas vezes, carnes ou resíduos do processamento desta (pele, lã, pêlos, chifres, penas e cascos). Esses resíduos contêm grande quantidade de proteínas com estruturas fibrosas, queratina e colágeno, sendo material suficiente para o desenvolvimento deste produto (VASILEVA-TONKOVA; NUSTOROVA; GUSHTEROVA, 2007).

2.2.7 Peptonas de pescado

A utilização de material proveniente de peixes como fonte de nutrientes para os microorganismos é relatada desde 1940, por Tarr e Deas (1949). O resíduo de pescado que, geralmente, é descartado ou utilizado para alimentação animal, poderá ser empregado na elaboração de produtos com elevado valor agregado. A importância de se pesquisar o fracionamento da silagem química está na obtenção de diferentes coprodutos que podem ser aplicados em diversos setores. A fração proteica poderia ser utilizada como fonte de compostos de interesse químico e nutricional na produção, por exemplo, de água peptonada, a partir da fração aquosa, para ser utilizada como meio de cultura microbiana, bem como, a partir da fração lipídica, como fonte de ácidos graxos.

Diversos estudos demonstram que as bactérias crescem bem em peptonas provenientes de tecidos de diferentes espécies de peixes (ASPMO; HORN; EIJSINK, 2005; CLAUSEN; GILDBERG; RAA, 1985; DERAZ et al., 2011; DUFOSSE; DE LA BROISE; GUERARD, 2001; GILDBERG; BATISTA; STROM, 1989; GILDBERG et al., 2010; SAFARI et al., 2012; SOUISSI et al., 2009; VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2004a; VÁZQUEZ; GONZÁLEZ; MURADO, 2004b; VÁZQUEZ et al., 2008; VIEIRA et al., 2005). Muitas vezes, estas peptonas promovem melhor crescimento que as peptonas comerciais. A razão para isto não é conhecida e não é explicada pelas diferenças na composição de aminoácidos (GILDBERG et al., 2010). Porém, sabe-se que os tecidos de peixes geralmente são mais ricos

em compostos nitrogenados solúveis do que a maioria dos outros tecidos biológicos (HAARD, 1995).

A peptona de vísceras de pescado demonstrou bom desempenho como fonte de nitrogênio para meio de crescimento microbiano; ao ser utilizado no cultivo de patógenos como *Vibrio salmonicida* para produção de vacinas (VECHT-LIFSHITZ; ALMAS; ZOMER, 1990). Vieira et al. (2005) constataram a efetividade de peptonas obtidas a partir de hidrólise enzimática de carne e de resíduo do processamento de lagostas (*Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*), camarão (*Macrobrachium amazonicum*) e pescada (*Plagioscion squamosissimus*) para utilização em meios de cultura no crescimento de *Escherichia coli*. Para Vázquez, González e Murado (2004a) que analisaram peptonas elaboradas com diferentes resíduos de pescado (albacora (*Thunnus albacares*), lula (*Loligo vulgaris*), peixe-espada (*Xiphias gladius*) e truta arco-íris (*Oncirhynchus mykiss*)) observaram que todas as peptonas foram mais eficientes que a peptona comercial comparada. Porém, para Vázquez, González e Murado (2006) as peptonas extraídas a partir de hidrolisados de resíduos do músculo de pescado não apresentaram bom resultado para crescimento microbiano.

Souissi et al. (2009) testaram hidrolisados proteicos de sardinhas (*Sardinella aurita*) como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento de *Staphylococcus simulans* e observaram que a peptona elaborada constituiu-se em bom substrato para o crescimento do micro-organismos testado. Deraz et al. (2011) utilizaram enzimas endógenas das vísceras de tilápia nilótica para elaboração de peptona em diferentes pHs e observaram que estas peptonas deram suporte para o crescimento de bactérias lácticas, recomendando o uso deste material no crescimento microbiano. O mesmo foi observado por Safari et al. (2012), que estudaram hidrolisados enzimáticos de resíduos de cabeças de albacora (*Thunnus albacares*) e demonstraram a efetividade do hidrolisado no crescimento de bactérias ácido-lácticas.

As peptonas comerciais que são normalmente utilizadas para meios de crescimento microbiano apresentam custo considerável. Portanto, a obtenção e avaliação da eficiência da peptona do resíduo de pescado e sua comparação aos produtos comerciais caracteriza-se não só como uma inovação tecnológica, mas também como uma provável solução do principal problema na utilização destes descartes, o baixo valor econômico dos coprodutos.

2.3 Conclusões

É de suma importância o desenvolvimento de novas tecnologias para utilização do material residual dos processamentos de pescado para elaboração de coprodutos. Espera-se encontrar novos caminhos onde haja a otimização do aproveitamento destes resíduos, via manejo adequado e fracionamento das frações obtidas, para que sejam transformados em coprodutos. Estas ações beneficiarão o setor pesqueiro, ao agregar valor ao seu resíduo e proporcionando a geração de patentes brasileiras.

A importância de se pesquisar o fracionamento da silagem química está na disponibilização da fração proteica como potencial fonte de compostos de interesse nutricional e na produção de água peptonada para uso como meio de cultura microbiana, bem como, em isolar esta fração aquosa, que seria interferente para manutenção da qualidade da fração lipídica como fonte de ácidos graxos. O fracionamento da silagem de pescado permite maior seletividade do processo hidrolítico e, conseqüentemente, maior possibilidade de utilização e investigação das frações obtidas, sendo o coproduto uma alternativa aos atuais produtos comerciais.

Referências

ANBE, L. **Prospecção de componentes bioativos em resíduos do processamento do pescado visando à sustentabilidade da cadeia produtiva**. 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ASPMO, S.I.; HORN, S.J.; EIJSINK, V.G.H. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 1957-1966, 2005.

BANCO DO NORDESTE. **Manual de impactos ambientais**. Orientações básicas sobre aspectos ambientais de atividades produtivas. Fortaleza: Banco do Nordeste, 1999. 297 p.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; MENDONÇA, R.; NUNES, M.L. Enzymatic hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) by-products and lipid recovery. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, London, v. 18, n. 1, p. 120-134, 2009.

BENITES, C.I. **Farinha de silagem de resíduo de pescado: elaboração, complementação com farelo de arroz e avaliação biológica em diferentes espécies**. 2003. 159 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

BOMBARDELLI, R.A.; SYPPERRECK, M.A.; SANCHES, E.A. Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 181-195, 2005.

BORGHESI, R.; FERRAZ DE ARRUDA, L.F.; OETTERER, M. A silagem de pescado na alimentação de organismos aquáticos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 329-339, 2007.

BORGHESI, R.; PORTZ, L.; OETTERER, M.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 242-248, 2008.

BOSCOLO, W.R. **Farinha de resíduos da indústria de filetagem de tilápias na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)**. 2003. 82 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 03 ago. 2010.

BROWN-PETERSON, N.J.; OVERSTREET, R.M.; LOTZ, J.M.; FRANKS, J.S.; BURNS, K.M. Reproductive Biology of Cobia, *Rachycentron canadum*, from coastal waters of the southern United States, **Fishery Bulletin**, Seattle, v. 99, p. 15-28, 2000.

BUENO, R.J. **Silagem ácida de resíduos da filetagem de tilápias em dietas de alevinos de piaçu *Leporinus macrocephalus***. 2006. 46 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2006.

CALLISTO, M.; BARBOSA, F. Diversidade de macroinvertebrados bentônicos e sua utilização como indicadores de qualidade de água. In: Congresso Brasileiro de Limnologia, 7., 1999, Florianópolis. **Anais...** Maringá, PR: Sociedade Brasileira de Limnologia, 1999. v. 1.

CARMO, J.R.; PIMENTA, C.J.; PIMENTA, M.E.S.G.; OLIVEIRA, M.M.; LOGATO, P.V.R.; FERREIRA, L.R.O. Caracterização de silagens ácidas de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 5, n. 5, p. 664-672, 2008.

CATCHPOLE, T.L.; GRAY, T.S. Reducing discards of fish at sea: a review of European pilot projects. **Journal of Environmental Management**, London, v. 91, n. 3, p. 717-723, 2010.

CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil: afinal, quais as espécies boas para cultivar? **Panorama da Aquicultura**, Laranjeiras, v. 17, n. 104, p. 50-55, 2007.

CENTENARO, G.S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SALAS-MELLADO, M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

CHO, S.S.; LEE, H.K.; YU, C.Y.; KIM, M.J.; SEONG, E.S.; GHIMIRE, B.K.; SON, E.H.; CHOUNG, M.G.; LIM, J.D. Isolation and Characterization of bioactive peptides from Hwangtae (*yellowish dried Alaska Pollack*) protein hydrolysates. **Journal of Food Science and Nutrition**, London, v. 13, n. 3, p. 196-203, 2008.

CLAUSEN, E.; GILDBERG, A.; RAA, J. Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 50, n. 6, p. 1556-1557, 1985.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002. 580 p.

DEGUARA, S.; JEUNCEY, K.; AGLUS, C. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. **Journal of Fish Biology**, London, v. 62, n. 5, p. 1033-1043, 2003.

DERAZ, S.F.; EL-FAWAL, G.F.; ABD-ELLATIF, S.A.; KHALIL, A.A. Autohydrolysed *Tilapia nilotica* fish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian Journal Microbiological**, New Delhi, v. 51, n. 2, p. 171-175, 2011.

DUFOSSÉ, L.; DE LA BROISE, D.; GUERARD, F. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: A new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2001.

EPELBAUM, M. **A influencia da gestão ambiental na competitividade e no sucesso empresarial**. 2004. 190 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ESPE, M.; RAA, J.; NJAA, L.R. Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 49, p. 259-270, 1989.

ESPÍNDOLA-FILHO, A. **Aproveitamento de resíduos sólidos de pescado como fertilizante marinho**. 1997. 98 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Mackenzie, São Paulo, 1997.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: 2012**. Rome, 2012. 230 p.

FELTES, M.M.C.; CORREIA, J.F.G.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; NINOW, J.L.; SPILLER, V.R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FERRAZ DE ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; OETTERER, M. Silagem ácida - uma tecnologia alternativa para aproveitamento do resíduo do processamento do pescado. **Revista Aquicultura & Pesca**, São Paulo, v. 14, p. 30-33, 2005.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; BRUM, A.; D'ARCE, M.A.B.R.; OETTERER, M. Nutritional aspects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) silage. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 749-753, 2006.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; OETTERER, M. Fish silage - a review. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 879-886, 2007.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; PORTZ, L.; CYRINO, J.E.P.; OETTERER, M. Fish silage in black bass (*Micropterus salmoides*) feed as an alternative to fish meal. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 5, p. 879-886, 2009

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by trans esterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

GERON, L.J.V.; ZEOULA, L.M.; VIDOTTI, R.M.; MATSUSHITA, M.; KAZAMA, R.; CALDAS NETO, S.F.; FERELI, F. Chemical characterization, dry mater and crude protein degradability and vitro intestinal digestion of acid and fermented silage from tilapia filleting residue. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 136, n. 3-4, p. 226-239, 2007.

GILDBERG, A.; BATISTA, I.; STROM, E. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 11, p. 413-423, 1989.

GILDBERG, A.; DAHL, R.; MIKKELSEN, H.; NILSEN, E.K. Peptones from Atlantic Cod stomach as a nitrogen sources in growth media to marine bacteria. **Journal Aquatic Food Product Technology**, London, v. 19, n. 2, p. 75-83, 2010.

GORMLEY, T.R. Fish a functional food. **Food Science and Technology**, London, v. 20, n. 3, p. 25-28, 2006.

HAARD, N.F. **Composition and nutritive value of fish proteins and other nitrogen compounds**. In: RUITER, A. (Ed.). **Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability**. Wallingford, UK: CAB International, 1995. p. 77-115.

JACOBSEN, C. Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: a multidisciplinary challenge. **Annals of the New York Academy Science**, New York, v. 1190, p. 141-150, 2010.

JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A.S. Utilization of byproducts and waste material from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, India, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JUSKAITÈ-NORBUTIENÈ, R.; MILIUTÈ, J.; CESNAITIS, R. Bio-degradable waste and by-products from food industry management systems in Lithuania: analysis, problems and improvement possibilities. **Environmental Research, Engineering and Management**, Kaunas, v. 4, n. 42, p. 60-69, 2007.

KADAM, S.U.; PRABHASANKAR, P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. **Food Research International**, Amsterdam, v. 43, p. 1975-1980, 2010.

KIM, S.K.; MENDIS, E.R. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, p. 383-393, 2006.

KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D.; SHAHIDI, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, p. 1317–1327, 2007.

KOMPIANG, I.P. Fish silage: its prospect and future in Indonesia. **Indonesia Agricultura Research & Development Journal**, Jakarta, v. 3, n. 1, p. 9-12, 1981.

MARTINS, V.G.; COSTA, J.A.V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; SÁNCHEZ, J.J. Fishery by-product as a nutriente source for bacterial and archaea growth media. **Bioresearch Technology**, Amsterdam, v. 96, p. 383-387, 2005.

MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília, 2012. 128 p

MIRANDA, F. F.; PORTO, M. R. A.; PACHECO, R. S.; HERNÁNDEZ-PRENTICE, C. Processo tecnológico destinado à obtenção de flocos de corvina (*Micropogon furnieri*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2003, Pelotas. **Resumos**. Pelotas: UFPel, 2003. CD Rom.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 95 p.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 179-187, 2006.

NOLASCO, A.M. **Resíduos da colheita e beneficiamento da caixeta – *Tabebuia cassinoides* (Lam) D.C.**: caracterização e perspectivas. 2000. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual do pescado. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 119-134, 1994.

OETERRER, M.; ESPÍNDOLA-FILHO, A.; MORALLES-ULLOA, D.F.; FERRAZ-ARRUDA, L.; BORGHESI, R. Bioconversão de resíduos do pescado para obtenção de subprodutos In: WORKSHOP BRASILEIRO EM APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DE PESCADO, 2003, Itajaí. Itajaí: WARP, 2003. CD-ROM.

OLIVEIRA, M.M.; PIMENTA, M.E.S.G.; CAMARGO, A.C.S.; FIORINI, J.E.; PIMENTA, C.J. Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico - análise bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1218-1223, 2006.

PELIZER, H.L; PONTIERI, H.M.; MORAES, O.I. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, Santiago, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

POERNOMO, A.; BUCKLE, K.A. Crude peptones from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 333-340, 2002.

RAA, J.; GIDBERG, A. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 11, p. 619-628, 1976.

RAI, A.K.; SWAPNA, H.C.; BHASKAR, N.; HALAMI, P.M.; SACHINDRA, N.M. Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 46, n. 1, p. 9-13, 2010.

RAMÍREZ, A. **Salmon by-product proteins**. Rome: FAO, 2007. 31 p. (Fisheries Circular, 1027).

RIBEIRO, J.C.J.; GARCIA, R.L.; ABREU, G.M.R.A.; LESSA, M.M.; STRAUS, E.L. **Nota Técnica. Utilização de resíduos sólidos**. ABNT NBR 10004:2004 – Resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. Disponível em: <<http://www.abnt.org.br/imagens/NOTATECNICA CONSOLIDADO FINAL.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2014.

RUXTON, C.H.S.; REED, S.C.; SIMPSON, M.J.A.; MILLINGTON, K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal Human Nutrition Dietetic**, London, v. 17, n. 5, p. 449-459, 2004.

SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; OVISSIPOUR, M.; REGENSTEIN, J.M.; GILDBERG, A.; RASCO, B. Use of hydrolysates from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. **Food Bioprocess Technology**, Heidelberg, v. 5, p. 73-79, 2012.

SANTOS, S.D.; MARTINS, V.G.M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Otimização dos parâmetros de produção de hidrolisados proteicos enzimáticos utilizando pescado de baixo valor comercial. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 72-77, 2009.

SEIBEL, N.F.; SOUZA-SOARES, L.A. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 333-337, 2003.

SHAFFER, R.V.; NAKAMURA, E.L. **Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae)**. Seattle, Washington: US. National Marine Fisheries Service, 1989. (FAO Fisheries Synopsis, 153). Disponível em: <http://spo.nwr.noaa.gov/tr82.pdf>.

SILVA, J.F.X. **Produção e caracterização de hidrolisado protéico provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiro e Aqüicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, G.G.H.; CAMARGO, A.F.M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aqüicultura. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 519-526, 2002.

SILVA, H.B.R.; LANDELL-FILHO, L.C. Silagem de subprodutos da filetagem de peixe na alimentação de suínos em crescimento – parâmetro de desempenho e organolépticos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 1137-1141, 2003.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown, v. 8, n. 3, p. 5, p. 451-457, 2009.

SOUZA, M.L.R. **Tecnologia para processamento das peles de peixe**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 2004. 59 p. (Coleção Fundamentum).

STONE, F.E.; HARDY, R.W. Nutritional value of acid stabilized silage and liquefied fish protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 37, n. 8, p. 797-803, 1986.

STROM, T.; EGGUM, B.O. Nutritional value of fish viscera silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 32, n. 2, p. 115-120, 1981.

SUCASAS, L.F.A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de coprodutos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva**. 2011. 164 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TARR, H.L.A.; DEAS, C.P. Bacteriological peptones from fish flesh. **Journal of Fishery Research Board Canada**, Ottawa, v. 7, p. 552-560. 1949.

TASKIN, M.; KURBANOGLU, E.B. Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, p. 826-834, 2011.

TATTERSON, J.N.; WINDSOR, M.L. Fish silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 25, n. 1, p. 369-379, 1974.

TIMOFIECSYK, F.R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 221-236, 2000.

TURATTI, J.M. Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. **Food Ingredients**, São Paulo, v. 9, p. 56-57, 2000.

VASILEVA-TONKOVA, E.; NUSTOROVA, M.; GUSHTEROVA, A. New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. **Current Microbiology**, New York, v. 54, p. 54-57, 2007.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. A new marine medium use a different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 35, p. 385-392, 2004a.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 112, p. 299-311, 2004b.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources factorial and kinetic studies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 605-613, 2006.

VÁZQUEZ, J.A.; DOCASAL, S.F.; PRIETO, M.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio-silage of fishing by-products. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 6246-6257, 2008.

VECHT-LIFSHITZ, S.E.; ALMAS, K.A.; ZOMER, E. Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 183-186, 1990.

VIDOTTI, R.M.; VIEGAS, E.M.M.; CARNEIRO, D.J. Amino acid composition of processed fish silage using diferent raw materials. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 199-204, 2003.

VIEIRA, G.H.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; MACRAE, A.; SOUZA, O.V. Peptone preparation from fishing by-products, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, p. 1235-1237, 2005.

ZAHAR, M.; BENKERROUM, N.; GUEROUALI, A.; LARAKI, Y.; EI-YAKOUBI, K. Effect of temperature, anaerobiosis, stirring and salt addition on natural fermentation silage of sardine and sardine wastes in sugarcane molasses. **Bioresource Technology**, Essex, v. 82, p. 171-176, 2002.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; MELLADO, M.S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1729-1742, 2009.

3 VIABILIDADE DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE RESÍDUO DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) NA RECUPERAÇÃO DE LIPÍDEOS E OBTENÇÃO DE COPRODUTOS

Resumo

O objetivo deste estudo foi desenvolver condições eficientes de hidrólise para o resíduo gerado nas indústrias processadoras de tilápia, avaliar o rendimento das frações aquosa, lipídica e do sedimento gerados na hidrólise proteica, além de investigar a presença de componentes de interesse nutricional na fração lipídica. Para tal, procedeu-se à verificação da viabilidade de se aumentar a disponibilização de lipídeos em resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*), utilizando diferentes enzimas, bem como, buscar os períodos de hidrólise proteica que possam propiciar melhor qualidade da fração lipídica adjacente. Ao resíduo do processamento de tilápia foram adicionadas enzimas comerciais constituídas de neutrase (E1) e alcalase (E2) agindo em diferentes tempos de hidrólise, a fim de se observar os melhores rendimentos. Os tratamentos se mostraram viáveis para obtenção de hidrolisado proteico, sendo que o tipo de enzima e o tempo de hidrólise determinaram o grau de fracionamento. As enzimas alcalase e neutrase apresentaram boa capacidade de hidrólise para obtenção das frações dos resíduos de tilápia, sendo observada a maior eficiência em 2 horas de hidrólise. A fração lipídica apresentou quantidade relevante de ácidos graxos poli-insaturados e adequada relação n-6/n-3. Através do fracionamento, é possível a obtenção de coprodutos distintos que podem ser destinados a setores agroindustriais diversificados.

Palavras-chave: resíduo, tilápia, rendimento, hidrólise proteica; fração lipídica; enzimas; ácidos graxos insaturados.

The feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste by proteolysis

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste using different enzymes for the protein hydrolysis and to minimize the periods of hydrolysis to evaluate the performance of the lipid fractions. When processing waste tilapia, commercial enzymes were added that were composed of neutrase (E1) and alcalase (E2) acting at different hydrolysis times to produce the best yields. The treatment proved feasible for obtaining the protein hydrolysates. The type of enzyme and the hydrolysis time determined the degree of fractionation. The enzymes performed well and the highest efficiency occurring within 2 hours of hydrolysis. The lipid fraction contained significant amounts of polyunsaturated fatty acids and an adequate n-6/n-3 ratio. The hydrolysis and fractionating, it was possible to obtain byproducts, preserving the physical-chemical characteristics of the oil, a greater yield.

Keywords: waste; tilapia; yield; lipid fraction; protein hydrolysis; lipid; enzymes; unsaturated fatty acids.

3.1 Introdução

Apesar de o pescado ser um alimento rico em nutrientes considerados essenciais à saúde, cerca de 40-50% da sua produção não é utilizada para alimentação humana, sendo eliminada pelas unidades de processamento via descarte sanitário, despejada nos corpos d'água ou enterrada. Estes descartes podem acumular-se causando problemas ambientais (VIDAL et al., 2011).

Este material, subaproveitado pelas indústrias, apresenta nutrientes como proteínas e ácidos graxos da série ômega-3 (FELTES et al., 2010), fosfolipídeos, escateno, vitaminas lipossolúveis e colesterol, presentes na fração lipídica (RAI et al., 2010), ou ainda, compostos bioativos com propriedades funcionais à saúde e com potencial para aplicações tecnológicas. Resíduos manuseados de forma correta podem ser transformados não só em matéria-prima para processos secundários, como, de forma mais vertical, em produtos comerciais para alimentação humana (FERRAZ DE ARRUDA; BORGHESI; OETTERER, 2007), e ainda, podem ser empregados no preparo de ração animal, fertilizante, iscas e artesanatos, tornando-se uma opção para aumentar a receita das indústrias (FELTES et al., 2010; VIDAL et al., 2011).

Algumas indústrias têm aplicado diferentes procedimentos para gerenciar o resíduo, a fim de promover um melhor aproveitamento deste. Neste contexto, a hidrólise proteica é uma tecnologia promissora, podendo ser aplicada às espécies de pescado de baixo valor comercial, bem como ao resíduo do beneficiamento do pescado (CENTENARO; PRENTICE-HERNÁNDEZ; SALAS-MELLADO, 2009).

Os hidrolisados proteicos de pescado podem ser obtidos por processos hidrolíticos desencadeados por meio da adição de enzimas, ou da ação de enzimas presentes no próprio pescado (MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009; SILVA, 2010). A hidrólise pode influenciar as características funcionais do produto final, como solubilidade, capacidade de retenção de água, formação de espuma e emulsificação (ZAVAREZE et al., 2009) e permite elaborar produtos com propriedades funcionais previamente definidas, que podem ser usados como ingredientes e/ou aditivos.

A hidrólise é um processo eficiente para obtenção de produtos de alta solubilidade, desde que sejam controlados os fatores envolvidos no processo como os reagentes químicos, tipo e concentração de enzima, substrato, temperatura, pH e tempo de incubação (CENTENARO; PRENTICE-HERNÁNDEZ; SALAS-MELLADO, 2009; MARTINS; COSTA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2009). A hidrólise enzimática pode ser uma eficiente técnica para a liberação de lipídeos do pescado, pois quando comparada com a extração

clássica, apresentou melhor rendimento (DUMAY; BARTHOMEUF; BERGE, 2004); a fração lipídica pode ser obtida por centrifugação pós-hidrólise (SLI'ZYTE et al., 2005). Um estudo conduzido com vísceras de sardinha (*Sardina pilchardus*) demonstrou que a hidrólise com proteases permite um melhor isolamento de lipídeos e fosfolipídeos em comparação com os métodos tradicionais (DUMAY et al., 2006), evitando o uso de condições drásticas, como produtos químicos e calor, que possam degradar componentes de interesse.

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver condições eficientes de hidrólise proteica para o resíduo gerado nas indústrias processadoras de tilápia, avaliar o rendimento das frações aquosa, lipídica e sedimento através do fracionamento por centrifugação, além de investigar a composição química da fração lipídica obtida de cada tratamento enzimático, através da determinação dos ácidos graxos poli-insaturados.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material

Para obtenção dos hidrolisados proteicos foram utilizados como matéria-prima os descartes do processo de filetagem da tilápia (*Oreochromis niloticus*), provenientes de unidade de beneficiamento de pescado, localizada na região metropolitana de Curitiba-PR. Este material era constituído de cabeça, vísceras, cauda, pele, espinhas e escamas.

As enzimas utilizadas para a hidrólise foram fornecidas pela Prozyn Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil). Foram utilizadas as enzimas neutrase (Protemax NP800) (E1) e alcalase (Protemex 580L) (E2).

3.2.2 Obtenção do hidrolisado proteico (HP)

Para obtenção dos hidrolisados utilizou-se 6 kg de resíduo. O procedimento para obtenção do hidrolisado ocorreu de acordo com Dumay et al. (2006). O resíduo bruto de tilápia foi triturado em triturador CAF (Picador de carne 98 BT parcial inox, motor de três CV) até a formação de massa homogênea. A partir deste material foram elaborados diferentes tratamentos (Tabela 3.1). O material foi homogeneizado com água destilada (1/1, m/v). Para ótima atividade enzimática foram utilizados os parâmetros estipulados pelas fichas técnicas dos fornecedores para uma ótima atividade: concentração 0,5% de enzima em relação ao peso da massa de resíduo de tilápia triturado (500g) em pH próximo a 7 e temperatura de 55°C. Cada mistura foi colocada em béqueres de vidro imersos água aquecida à temperatura de

55°C, onde permaneceram pelos tempos determinados para hidrólise. Os parâmetros temperatura e pH foram monitorados ao longo do experimento (potenciômetro digital, Digimed). Ao atingirem o tempo de hidrólise pré-determinado, os recipientes foram submetidos à temperatura de 80°C, durante 10 minutos, para desativação das enzimas.

Tabela 3.1 - Tratamentos enzimáticos para hidrólise protéica de resíduos de tilápia

Tratamento	Descrição
T1	E1 x 1 hora de hidrólise
T2	E1 x 2 horas de hidrólise
T3	E1 x 4 horas de hidrólise
T4	E2 x 1 hora de hidrólise
T5	E2 x 2 horas de hidrólise
T6	E2 x 4 horas de hidrólise

E1: enzima neutrase; E2: enzima alcalase.

Para a análise da composição centesimal (umidade, proteína, lipídeos e cinza) todas as análises foram realizadas em triplicata de acordo com *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (1995) para o resíduo bruto. A umidade foi determinada através do método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante. A análise de proteínas foi realizada através do método Micro-Kjeldhal, com digestão em bloco digestor e em seguida destilação com posterior titulação com ácido sulfúrico 0,01N. A fração lipídica foi obtida pelo método Soxhlet, utilizando-se como solvente o hexano, seguido de aquecimento em estufa até evaporação total do solvente. O teor de matéria mineral foi medido pelo método gravimétrico, carbonizando-se a amostra em mufla a 550°C. Os resultados foram calculados em base seca e expressos em g 100 g⁻¹.

Para a realização do fracionamento, os hidrolisados foram centrifugados (Centrífuga refrigerada 5810R, marca Eppendorf) a 17.600 força g, por 30 minutos a 0°C. Três fases foram obtidas (sedimento, fase aquosa e fase lipídica), sendo estas, armazenadas sob congelamento (-20°C), para posterior análise (DUMAY et al., 2006).

3.3.3 Análise de rendimento

O rendimento das frações foi calculado em porcentagem. As amostras foram pesadas antes e depois do fracionamento, sendo que as fases obtidas foram pesadas individualmente para obtenção do rendimento. Os cálculos foram feitos em relação ao peso do hidrolisado e expressos em porcentagem de sedimentado, de fração lipídica e de fração aquosa.

3.3.4 Extração dos lipídeos

A extração dos lipídeos foi realizada de acordo com o método descrito por Folch, Lees e Sloan-Stanley (1957). Foi pesado 1 g de material seco e homogeneizado em 4 mL de água destilada. Metanol foi adicionado (3:20 v/v) e em seguida as amostras foram agitadas por 30 minutos antes da adição do clorofórmio (3:40 v/v). O sistema foi agitado por mais 30 minutos antes da filtração e foram adicionados 0,9% de NaCl. Após 15 minutos de decantação, a 4°C, em funil de separação no escuro, obtiveram-se os lipídeos de interesse. Os extratos de lipídeos foram secos em evaporador rotativo (temperatura < 35°C) e em seguida foram pesados e os resultados expressos em g de lipídeos / g de material seco. Os extratos de lipídeos foram mantidos em 10 mL de clorofórmio e armazenados a -80°C até o momento das análises.

3.3.5 Preparo dos ésteres metílicos para cromatografia gasosa

Os ésteres metílicos foram obtidos conforme metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). No processo de transesterificação, o material lipídico foi descongelado, homogeneizado e, aproximadamente, 200 mg de amostras foram transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca; foi adicionado 5 mL de NaOH metanólico, seguido de aquecimento por imersão em água a 65-70°C por 15 minutos. À solução quente foram adicionados 10 mL do reagente de esterificação (solução de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol) sendo em seguida mantida sob aquecimento por mais 10 minutos. Após resfriamento das amostras foi adicionado 2 mL de éter de petróleo e completado o volume com solução saturada de cloreto de sódio.

3.3.6 Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi realizada através de cromatógrafo gasoso (Konic – Modelo HRGC 4000A) com detector de chama, em coluna cromatográfica de sílica fundida-CP Sil 88 Tailor Made FAME (Chrompak). A cromatografia gasosa foi realizada conforme *American Oil Chemist's Society* (AOCS) (1998) – método Ce 1-62; Ce 1b-89; Ce 1c-89. A temperatura da coluna foi posicionada na faixa de 180 a 225°C, com taxa de aquecimento de 1°C por minuto, enquanto que a temperatura do detector e do injetor foi fixada em 300°C. A vazão do gás de arraste (hidrogênio) era de 0,5 mL/minuto.

3.3.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparação de médias de Tukey ajustado ao nível descritivo de $\alpha = 0,05$, utilizando o Software Statistica Version 11.

3.3.8 Resultados e Discussão

3.3.8.1 Composição centesimal da matéria prima utilizada

A composição química centesimal dos resíduos de tilápia, em g 100g⁻¹ de matéria seca, apresentou 41,95 ± 1,07 de matéria seca; 13,90 ± 2,83 de minerais; 29,30 ± 0,88 de proteína e 16,04 ± 2,87 de lipídeos.

Observa-se que o teor de proteína bruta é considerável, uma vez que este material refere-se ao resíduo da filetagem da tilápia, o que reforça a necessidade de recuperação das proteínas. Este material representa aproximadamente 69 % da proteína bruta, originalmente presente na tilápia inteira, que fica retida nos resíduos que normalmente são descartados. O teor de minerais é elevado neste material, principalmente por conter a coluna vertebral e a cabeça.

Anbe (2011) avaliando resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) observou valores elevados para proteínas, lipídeos e cinzas, 65,64, 21,25 e 13,13 g 100g⁻¹, respectivamente. Kechaou et al. (2009) estudando hidrolisados de lula (*Sepia officinalis*) e sardinha (*Sardina pilchardus*) encontraram para o material cru, valores um pouco abaixo para teor de proteína, 15,90 e 15,76 g.100g⁻¹, respectivamente. Para cinzas, estes mesmos autores encontraram também valores menores para os resíduos de lula e sardinha, 2,01 e 1,9 g 100g⁻¹,

respectivamente, o que mostra que os resíduos utilizados neste experimento apresentaram maiores valores. Martins, Costa e Prentice-Hernández (2009), estudando amostras de corvina (*Micropogonias furnieri*) encontraram para o resíduo liofilizado 64,26 g 100g⁻¹ de proteína, 21,09 g 100g⁻¹ de lipídeos e 8,07 g 100g⁻¹ de cinzas. Estes valores diferem dos encontrados neste experimento, onde foram observados valores maiores de cinzas e valores menores de proteína e lipídeos, para as amostras de resíduo de tilápia. Essa diferença pode ser atribuída à variação de uma espécie para outra e até dentro da mesma espécie, dependendo da época do ano, tipo de alimentação, grau de maturação gonadal e sexo. Diferentes espécies de pescado e o tipo de músculo, branco ou escuro, também podem ser os responsáveis pelos diferentes valores de proteína (DISNEY; HOFFMAN, 1978; LANTZ, 1966; MAI et al., 1980; SALES, 1995; SHARDA; MAHAN; WILSON, 1976; TATTERSON; WINDSON, 1974).

3.3.8.2 Hidrólise enzimática e rendimento das frações

A hidrólise proteica dos resíduos de tilápia ocorreu de forma rápida em condições de temperatura (55°C) e pH (7,0) adequados à ação enzimática, permitindo a formação de produto com coloração marrom clara, aroma suave (característico de resíduo de pescado) e solúvel (Figura 3.1). A fração lipídica correspondeu, em média, a 15% do hidrolisado total, podendo ser utilizado o fracionamento para direcionar esta amostra para obtenção de outros produtos em estudos posteriores. Houve diferença ($p < 0,05$) quanto ao rendimento da fração lipídica, onde os tratamentos T3 e T5 apresentaram maior rendimento com 21 e 22%, respectivamente (Tabela 3.2). Não houve diferença ($p > 0,05$) para o rendimento do sedimento (Tabela 3.2). Houve diferença ($p < 0,05$) quanto ao rendimento da fração aquosa (solúvel), mas ao contrário do observado para fração lipídica, T3 e T5 apresentaram os menores rendimentos, 33 e 28%, respectivamente (Tabela 2).

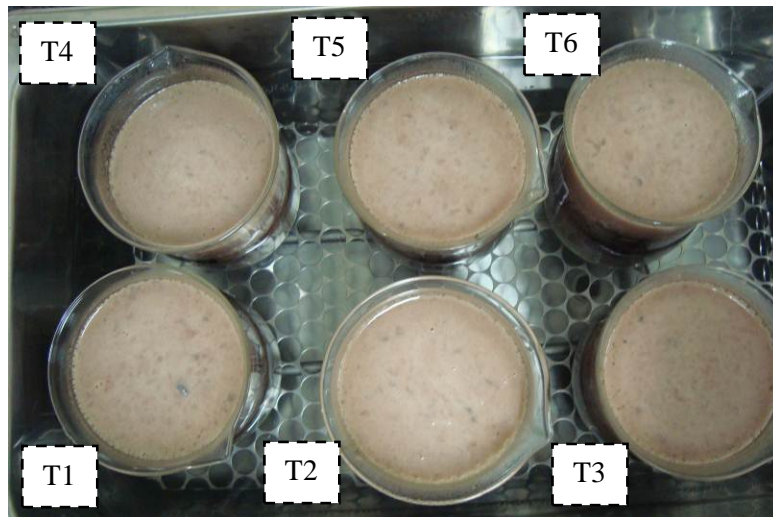


Figura 3.1 - Hidrolisados proteicos obtidos de resíduos de Tilápia em diferentes tratamentos. T1: E1 - neutrase x 1 hora de hidrólise; T2: E1 x 2 horas de hidrólise; T3: E1 x 4 horas de hidrólise; T4: E2 - alcalase x 1 hora de hidrólise; T5: E2 x 2 horas de hidrólise; T6: E2 x 4 horas de hidrólise.

O tipo de enzima e o tempo de hidrólise determinaram a proporção da fração de interesse, pois as enzimas utilizadas agiram na hidrólise das proteínas, exercendo sua atividade ótima nas primeiras horas de hidrólise (Tabela 3.2). Segundo Silva (2010) a alcalase é a enzima que mais tem sido aplicada em indústrias na obtenção de hidrolisados, por não interferir de forma objetável no sabor do produto e apresentar melhores características físico-químicas e de rendimento, mesmo quando no processo ocorre elevado grau de hidrólise.

Tabela 3.2 - Rendimento das frações solúvel, insolúvel e lipídica, obtidas pelo fracionamento do hidrolisado proteico de tilápia, em porcentagem

Hidrolisado Proteico	Fração aquosa	Sedimento	Fração Lipídica
T1	50±0,07 ^a	42±0,02 ^a	8±0,05 ^b
T2	39±0,08 ^{ab}	44±0,02 ^a	17±0,07 ^a
T3	33±0,08 ^b	46±0,08 ^a	21±0,06 ^a
T4	48±0,03 ^a	43±0,00 ^a	10±0,03 ^b
T5	28±0,03 ^b	50±0,03 ^a	22±0,12 ^a
T6	38±0,08 ^{ab}	49±0,02 ^a	12±0,07 ^b

T1: Enzima neutrase (E1) e 1 hora de hidrólise; T2: E1 e 2 horas de hidrólise; T3: E1 e 4 horas de hidrólise; T4: Enzima alcalase (E2) e 1 hora de hidrólise; T5: E2 e 2 horas de hidrólise; e T6: E2 e 4 horas de hidrólise.

Médias das triplicatas ± desvio padrão (DP); valores na mesma coluna com diferentes letras diferem pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

O fracionamento do hidrolisado proteico permite a determinação, isoladamente, de possíveis compostos de interesse nutricional nas frações, permitindo, assim, a aplicação das frações ou dos coprodutos em diferentes setores industriais, o que incentiva a sustentabilidade da cadeia produtiva do pescado. Além disso, o fracionamento permite a remoção da fração lipídica dos coprodutos refletindo na maior estabilização oxidativa dos hidrolisados proteicos e da silagem ou dos produtos que receberam sua inclusão (Figura 3.2).



Figura 3.2 - Frações do hidrolisado proteico de resíduo de tilápia após centrifugação
T3: Enzima neutrase (E1) x 4 horas de hidrólise

3.3.8.3 Perfil de ácidos graxos da fração lipídica

A carne de pescado tem sido objeto de inúmeras pesquisas relacionadas à sua composição em ácidos graxos poli-insaturados, os quais estão diretamente associados à saúde humana pelo seu efeito protetor, principalmente contra doenças cardiovasculares e reumáticas (CALDER, 2003; HARRIS, 1999; HUNTER; ROBERTS, 2000; JUSTI et al., 2003; UAUY; VALENZUELA, 2000). A composição em ácidos graxos da fração lipídica dos hidrolisados está apresentada na Tabela 3.3. Os ácidos graxos presentes são, predominantemente, os insaturados, sendo o linolêico e oléico aqueles em maior quantidade, para a maioria dos tratamentos. Entre os ácidos graxos saturados, o palmítico e o esteárico se apresentaram em

teores mais elevados, conforme relatado para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (EL-HUSSEINY et al., 2010) e para o surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) (MARTINO et al., 2002).

A composição em ácidos graxos dos peixes pode ser influenciada por uma série de fatores, entre eles a temperatura, a salinidade e a alimentação. Diversos autores relatam que a composição em ácidos graxos do tecido muscular reflete a composição de ácidos graxos da dieta (DURAZO-BELTRÁN et al., 2003; JOBLING; BENDIKSEN, 2003; JUSTI et al., 2003; LEE; LEE; KIM, 2003; TIDWELL; COYLE; BRIGHT, 2007; VISENTAINER et al., 2005). Em peixes de água doce como a tilápia, é esperado que o teor de ácidos graxos Omega-3 seja menor que em peixes marinhos. Este fato está associado a vários fatores, dentre os quais as diferenças relacionadas à bioquímica do metabolismo dos ácidos graxos essenciais nos peixes marinhos e de água doce e à composição dos alimentos ingeridos nos dois habitats (ZENEBE; AHLGREN; GUSTAFSSON, 1998). Portanto, os resultados desta pesquisa (Tabela 3.3) corroboram os apresentados por Maia et al. (1998) que avaliaram a fração lipídica da silagem de resíduo de tilápia, bem como, por Ferraz de Arruda et al. (2009) com a mesma espécie visando utilização em rações para a aquicultura. Estes autores avaliaram coprodutos obtidos de tilápias provenientes de cultivo e encontraram apenas traços dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3). Além disso, no presente estudo, os valores encontrados para o DHA, foram maiores que os do EPA, o que corrobora os valores apresentados para outras espécies de peixes de água doce (ANDRADE et al., 1995; RAMOS-FILHO et al., 2008).

Tabela 3.3 - Ácidos graxos da fração lipídica de resíduo centrifugado e de hidrolisados de tilápia (%)

Ácidos graxos	Resíduo	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Mirístico (C14:0)	0,94	0,20	3,25	1,95	-	3,26	1,56
Pentadecanóico (C15:0)	0,06	0,04	0,19	0,12	0,21	0,19	0,09
Palmítico (C16:0)	6,66	13,54	23,48	14,35	22,05	23,89	11,59
Heptadecanóico (C17:0)	0,06	0,13	0,21	0,13	0,24	0,20	0,11
Estearico (C18:0)	1,83	4,84	6,43	3,98	5,29	6,63	3,24
Araquídico (C20:0)	0,06	0,29	0,20	0,10	-	0,18	0,11
Heneicosanóico (C21:0)	0,01	0,03	0,03	0,01	-	0,03	0,02
Behênico (C22:0)	-	0,31	0,05	0,01	-	0,05	0,02
Tricosanóico (C23:0)	0,00	0,04	0,02	0,01	-	0,02	0,01
Lignocérico (C24:0)	0,02	0,07	0,30	0,19	0,25	0,30	0,12
<i>Gorduras Saturadas</i>	<i>9,66</i>	<i>19,48</i>	<i>34,15</i>	<i>20,87</i>	<i>28,04</i>	<i>34,81</i>	<i>16,90</i>
Miristoleico (C14:1)	0,02	0,01	0,18	0,09	0,21	0,19	0,09
Palmitoleico (C16:1)	0,77	0,26	5,98	3,66	5,29	6,09	2,94
Oléico (C18:1n9c)	4,45	23,9	34,80	21,69	33,10	35,88	17,51
Cis-Eicosenóico (C20:1)	0,30	0,13	2,26	1,42	2,01	2,36	1,16
<i>Gorduras Monoinsaturadas</i>	<i>5,57</i>	<i>23,50</i>	<i>43,22</i>	<i>27,02</i>	<i>40,61</i>	<i>44,60</i>	<i>21,72</i>
Linolêico (C18:2n6c)	0,77	49,65	14,49	8,91	13,21	14,78	7,17
Gama linolênico (C18:3n6)	0,03	0,03	0,86	0,52	0,72	0,09	0,41
Ácidos graxos	Resíduo	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Linolênico (C18:3n3)	0,05	5,87	1,01	0,62	0,86	1,03	0,50
Cis-Eicosadienóico (C20:2)	0,00	0,00	0,07	0,04	0,06	0,06	0,04
Cis-Eicosatrienóico (C20:3n3)	0,01	-	0,14	0,08	-	0,13	0,32
Cis-Eicosatrienóico (C20:3n6)	0,02	-	0,64	0,38	0,49	0,66	0,32
Araquidônico (C20:4n6)	0,03	-	0,89	0,51	0,71	0,88	0,43
Docosadienóico (C22:2n6)	0,16	-	0,02	0,02	-	-	-
Cis-Eicosapentaenóico (C20:5n3)	0,00	-	0,07	0,04	0,29	0,05	0,03
Cis-Docosahexaenóico (C22:6n3)	0,09	-	1,53	0,90	-	1,53	0,65
<i>Gorduras Poli-insaturadas</i>	<i>1,16</i>	<i>55,56</i>	<i>19,71</i>	<i>12,02</i>	<i>16,34</i>	<i>19,21</i>	<i>9,61</i>
<i>Gorduras Trans</i>	<i>0,04</i>	<i>0,00</i>	<i>0,54</i>	<i>0,28</i>	<i>0,00</i>	<i>0,55</i>	<i>0,27</i>
Ômega 3	0,15	5,87	2,74	1,64	1,15	2,74	1,24

T1: Enzima neutrase (E1) e 1 hora de hidrólise; T2: E1 e 2 horas de hidrólise; T3: E1 e 4 horas de hidrólise; T4: Enzima alcalase (E2) e 1 hora de hidrólise; T5: E2 e 2 horas de hidrólise; e T6: E2 e 4 horas de hidrólise.

Embora ainda não tenha sido estabelecida a quantidade para ingestão e as razões ideais entre os ácidos graxos das famílias n-6 e n-3, valores abaixo de quatro (*Department of Health and Social Security*, 1994) e cinco (*World Health Organization - WHO*, 1994) são considerados desejáveis para uma dieta saudável. A razão n-6/n-3 das frações lipídicas obtidas nessa pesquisa foi próxima de 1,1. Portanto, todos os tratamentos produziram óleos de peixes potencialmente saudáveis ao consumo humano.

De acordo com Simopoulos (1999), a razão n-6/n-3 nas dietas ocidentais tem variado de 20:1 a 30:1, valores muito acima dos considerados desejáveis de 1:1 a 2:1, relatados pelos autores. Se considerarmos a razão citada por estes autores, as frações lipídicas podem ser utilizadas para consumo humano como fonte de lipídeos poli-insaturados, na forma encapsulada. O uso destas fontes mostra-se viável, quando o objetivo for agregar valor ao resíduo de pescado, que seria descartado e oferecer um produto diferenciado, com relação adequada de n-6/n-3, a um mercado crescente em busca de fontes energéticas sustentáveis e saudáveis. Outra opção seria a utilização das frações lipídicas como palatilizantes ou fontes energéticas em rações para aquicultura. As fontes de lipídeos que fornecem boa relação n-6/n-3 são de extrema importância nas dietas comerciais e possuem alto valor comercial.

Segundo estudos de Dumay et al. (2009) o tempo de hidrólise é um fator considerável que pode influenciar na obtenção de diferentes compostos de acordo com a resposta da atividade enzimática. Com a hidrólise, o rompimento dos tecidos obtidos no início da proteólise parece suficiente para liberar os lipídeos de interesse. Este fenômeno é devido à geração de peptídeos de cadeia curta durante a hidrólise extensa, o que sugere que os peptídeos produzidos tenham regiões hidrofóbicas mais acessíveis para interagir com os lipídeos, podendo então ser recuperados pelo processo de centrifugação. Estas observações confirmam os resultados obtidos nesse experimento, onde se observou que em tempos menores de hidrólise (1 e 2 horas) foi possível obter frações lipídicas com bom perfil de ácidos graxos (Tabela 3.3).

3.4 Conclusões

Os processos para obtenção de hidrolisados proteicos são simples e de fácil manuseio. As enzimas alcalase e neutrase apresentaram boa capacidade de hidrólise e obtenção das frações dos resíduos de tilápia, sendo sua maior eficiência observada nos menores tempos (2 horas). Foi possível identificar os ácidos graxos presentes na fração lipídica dos hidrolisados de tilápia, sendo estes, predominantemente, os insaturados. O

hidrolisado proteico mostrou-se como uma alternativa para aproveitar o resíduo da indústria processadora de tilápia. Através do fracionamento, obtêm-se coprodutos que podem ser aplicados na elaboração de produtos para alimentação animal, pois no caso da fração lipídica, os tratamentos apresentaram quantidade relevante de lipídeos poli-insaturados e adequada relação n-6/n-3.

Este estudo dispõe do artigo aceito para publicação pela revista *Journal of Aquatic Food Product Technology* (Anexo A).

Referências

ANBE, L. **Prospecção de componentes bioativos em resíduos do processamento do pescado visando à sustentabilidade da cadeia produtiva**. 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ANDRADE, A.D.; RUBIRA, A.F.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E. ω 3 fatty acids in freshwater fish from south Brazil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 1207-1210, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 14. ed. Washington, DC, 1995. 1141 p.

AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY - AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**. 5. ed. Champaign, 1998.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, p.433-446, 2003.

CENTENARO, G.S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SALAS-MELLADO, M. Efeito da concentração de enzima e de substrato no grau de hidrólise e nas propriedades funcionais de hidrolisados proteicos de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1792-1798, 2009.

DISNEY, J.G.; HOFFMAN, A. Development of a fish silage/carbohydrate animal feed for use in the tropics. **Tropical Science**, London, v. 20, p. 129-135, 1978.

DURAZO-BELTRÁN, E.; D'ABRAMO, L.R.; TORO-VAZQUEZ, J.F.; VAZQUES-PELÁEZ, C.; VIANA, M.T. Effect of triacylglycerols in formulated diets on growth and fatty acid composition in tissue of green abalone (*Haliotis fulgens*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 224, p. 257-270, 2003.

DUMAY, J.; BARTHOMEUF, C.; BERGE, J.P. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. **Journal of Aquatic Fish Product and Technology**, London, v. 13, p. 69-84, 2004.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J.P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2327-2332, 2006.

DUMAY, J.; ALLERY, M.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; CARBONNEAUD, M.E.; BERGE, J.P. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) headswith Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 89, p. 1599-1606, 2009.

EL-HUSSEINY, O.M.; ABDUL-AZIZ, G.M.; GODA, A.M.A.-S.; SULOMA, A. Effect of altering linoleic acid and linolenic acid dietary levels and ratios on the performance and tissue fatty acid profiles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fry. **Aquaculture International**, Heidelberg, v. 18, p. 1105-1119, 2010.

FELTES, M.M.C.; CORREIA, J.F.G.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; NINOW, J.L.; SPILLER, V.R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; OETTERER, M. Fish silage - a review. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 879-886, 2007.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; PORTZ, L.; CYRINO, J. E. P.; OETTERER, M. Fish silage in black bass (*Micropterus salmoides*) feed as an alternative to fish meal. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 5, p. 879-886, 2009.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOAN-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 225, p. 497-509, 1957.

HARRIS, W.S. Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceridemia: focus on fish oils. **Clinical Cardiology**, Mahwah, v. 22, n. 2, p. 40-43, 1999.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, p. 475-477, 1973.

HUNTER, B.J.; ROBERTS, D.C.K. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. **Nutrition Research**, New York, v. 20, p. 1047-1058, 2000.

JOBLING, M.; BENDIKSEN, E.A. Dietary lipids and temperature interact to influence tissue fatty acid composition of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 34, p. 1423-1441, 2003.

JUSTI, K.C.; HAYASHI, C.; VISENTAINER, N.E.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. **Food Chemistry**, Barking, v. 80, p. 489-493, 2003.

KECHAOU, E.S.; DONNAY-MORENO, C.; JAOUEN, P.; GOUYGOU, J.P.; BEGÉ, J.P.; BEN-AMAR, R. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardine pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, p. 158-164, 2009.

LANTZ, A.W. Special products from freshwater fish. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 151, p. 45-48, 1966.

LEE, S-M.; LEE, J.H.; KIM, K-D. Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 225, p. 269-281, 2003.

MAI, J.; SHETTY, J.K.; KAN, T.M.; KINSELLA, J.E. Protein and amino acid composition of select freshwater fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, p. 884-885, 1980.

MAIA, W.M.; NUNES, M.L.; FIGUEIREDO, M.J.; BRAGAGNOLO, N. Caracterização da fração lipídica de silagem de resíduo de tilápia para utilização em rações para a aquicultura. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 10., 1998, Recife. **Anais...** Recife: Persona, 1998. v. 2, p. 55-64.

MARTINS, V.G.; COSTA, J.A.V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L.C. Performance and fatty acid composition of surubim, *Pseudoplatystoma coruscans* fed diets with animal and plant lipids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, p. 233-246, 2002.

RAMOS-FILHO, M.M.; RAMOS, M.I.L.; HIANE, P.A.; SOUZA, E.M.T. Perfil lipídico de quatro espécies da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 361-365, 2008.

SALES, R.O. **Processamento, caracterização química e avaliação nutricional da silagem da despesca da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em dietas experimentais com ratos**. 1995. 174 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

SHARDA, D.P.; MAHAN, D.C.; WILSON, R.F. Limiting amino acid in low protein corn soybean meal diets for growing-finishing swine. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 42, n. 5, p. 1175-1181, 1976.

SILVA, J.F.X. **Produção e caracterização de hidrolisado proteico provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiro e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 70, p. 560S-569S, 1999.

SLI'ZYTE, R.; DAUKSAS, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morshua*) by-products. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1415-1424, 2005.

TATTERSON, J.N.; WINDSOR, M.L. Fish silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 25, p. 369-379, 1974.

TIDWELL, J.H.; COYLE, S.; BRIGHT, L.A. Effects of different types of dietary lipids on growth and fatty acid composition of largemouth bass. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 69, p. 257-264, 2007.

UAUY, R.; VALENZUELA, A. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. **Nutrition**, New York, v. 16, p. 680-684, 2000.

VIDAL, J.M.A.; RODRIGUES, M.C.P.; ZAPATA, J.F.F.; VIEIRA, J.M.M. Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 92-99, 2011.

VISENTAINER, J.V.; SALDANHA, T.; BRAGAGNOLO, N.; FRANCO, M.R.B. Relação entre teores de colesterol em filés de tilápias e níveis de óleo de linhaça na ração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 310-314, 2005.

ZAVAREZE, E.R.; SILVA, C.M.; MELLADO, M.S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p. 1729-1742, 2009.

ZENEBE, T.; AHLGREN, G.; GUSTAFSSON, I.B. Fatty acid and lipid content on *Oreochromis niloticus* L. in Ethiopian lakes – dietary effects of phytoplankton. Ecology of Freshwater Fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 7, p. 146-158, 1998.

4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E SELEÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA ELABORAÇÃO DE COPRODUTO A PARTIR DE RESÍDUO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*).

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar o resíduo de tilápia (*Oreochromis niloticus*), avaliando sua estabilidade através de análises físico-químicas e microbiológicas, durante o período de 40 dias de armazenamento a temperatura ambiente de, aproximadamente, 25°C. Para a elaboração da silagem foi utilizado o resíduo do processamento de tilápia e diferentes formulações de ácidos, sendo a T1 composta de ácido cítrico: ácido fórmico (1:3 v/v) 3% v/m; T2, ácido propiônico: ácido fórmico (1:3 v/v) 3% v/m e T3, ácido cítrico 5% v/m. As amostras foram submetidas às avaliações físico-químicas e microbiológicas. Os resultados da composição química demonstraram teores elevados de cinzas, diretamente relacionados com a presença de escamas, cabeça, coluna vertebral, ossos e nadadeiras. Os altos teores de proteínas na silagem e no resíduo implicam na presença de nitrogênio, aminoácidos livres e peptídeos. Os tratamentos T1 e T2 apresentaram menores contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras, indicando boas condições gerais do produto armazenado por um longo período de tempo, suficiente para garantir boa estabilidade do produto final. Visualmente, as silagens de ambos os tratamentos apresentaram a fase lipídica com aparência oleosa e mais escura, a fase aquosa portou-se como um líquido amarelado e pastoso, e a fase sedimentada apresentou-se, acinzentada e de textura rígida, uma vez que a matéria-prima utilizada, continha material ósseo, influenciando assim na coloração observada. A estabilidade ao longo de 40 dias de armazenamento a temperatura ambiente ocorreu de forma satisfatória para os tratamentos T1 e T2. A silagem mostrou-se uma alternativa na produção de coprodutos.

Palavras-chave: resíduo, silagem, estabilidade de coproduto, composição química, rendimento de frações, tilápia.

Stability evaluation and organic acids selection for preparation of waste byproduct from tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Abstract

The objective of this study was to characterize tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste by assessing its stability through physical, chemical and microbiological analyzes during the period of 40 days of storage at room temperature (25°C). Silage processing was prepared with different acid formulations: citric acid: formic acid (1:3 v/v) 3% v/m (T1); propionic acid: formic acid (1:3 v/v) 3% v/m (T2), and citric acid 5% v/m (T3). The samples were then submitted to physical, chemical and microbiological analyzes. Silage chemical composition showed high ash levels, which is directly related to the presence of scales, head, spine, bones and fins in the fish waste. Waste and silage high amounts of protein imply in the presence of nitrogen, free amino acids and peptides with antioxidant properties. T1 and T2 showed lower count in growth of aerobic mesophilic microorganisms, yeasts and molds, indicating they kept, even after stored for a long time, a good product general quality, enough to ensure a good stability to the final product. Visually, T1 and T2 treatments silages showed the lipid phase with an oily and darker appearance, while the aqueous one appeared as a viscous yellowish liquid and the sediment phase with a hard texture and a gray color related to the presence of bones in the raw material. There was a satisfactory stability for T1 and T2 over the 40 days of storage. The results proved silage is an alternative for tilapia byproducts production.

Keywords: waste, silage, byproduct stability, chemical composition, fraction yield, tilapia.

4.1 Introdução

Segundo a FAO (2012), cerca de 20,2 milhões de t de pescado foram destinados a fins não alimentares, dos quais 75% foram direcionados à fabricação de farinha de peixe e óleo; os restantes, 5,1 milhões de t, foram utilizados para fins ornamentais, para cultivo na forma de alevinos, como iscas, para fins farmacêuticos e também, como matéria-prima para alimentação direta da aquicultura. Este material, em sua maioria, é composto de vísceras, pele, escamas e ossos e apresenta-se como considerável fonte de proteínas, lipídeos e minerais. A fração lipídica possui em sua composição, ácidos graxos de estrutura ômega-3, fosfolipídeos, escaleno, vitaminas lipossolúveis, colesterol e outros compostos (MAIA et al., 1998; RAI et al., 2010). A fração proteica pode conter peptídeos bioativos com atividade anti-hipertensiva, imuno-reguladora e antioxidante (KIM et al., 2000).

O apreciável volume de resíduos gera um problema crucial, pois interfere na sustentabilidade da cadeia produtiva. Portanto, estudos que priorizem a minimização dos resíduos ao longo da cadeia produtiva e a sua reciclagem poderão dispor soluções, servindo de suporte para definição de políticas públicas que orientem a expansão do agronegócio do pescado dentro de bases ambientalmente sustentáveis no Brasil. É premente a necessidade de utilização dos descartes do processamento, pois há previsão de aumento da atividade de beneficiamento, devido à exigência do mercado. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material residual pode ser convertido em produtos comerciais ou matéria-prima para processos secundários (FERRAZ DE ARRUDA; BORGHESI; OETTERER, 2007).

No Brasil, o aproveitamento de resíduos de pescado é mínimo; cerca de 50% da biomassa é descartada durante o processo de enlatamento ou em outras linhas de produção que envolva a filetagem. Nas indústrias do Sul do Brasil, aproximadamente, 68% dos resíduos são destinados às indústrias de farinha de peixe, 23% ao aterro sanitário municipal e 9% são despejados diretamente nos rios (STEVANATO, 2007). Por constituírem resíduos agroindustriais ricos em nutrientes, toda e qualquer técnica que vislumbre seu aproveitamento na alimentação animal ou agrícola torna-se interessante, tendo em vista, que a reciclagem desses nutrientes é recomendável. No caso de não ser possível ou recomendável o aproveitamento desse material *in natura*, técnicas de tratamento devem ser aplicadas com a finalidade de proporcionar transformações vantajosas em suas características químicas ou físicas. O material que não possui qualidade para o consumo humano, pode ser utilizado para produção de silagem ácida de pescado, como fertilizante ou como ingrediente para ração animal em dietas para a aquicultura (SUCASAS, 2011). Alternativa de grande potencial é o

aproveitamento dos resíduos do processamento, na forma de hidrolisados proteicos ou silagem, por conterem proteína, peptídeos, aminoácidos livres e flavorizantes, além de ácidos graxos da série ômega-3, caracterizando-se como uma fonte nutricional a ser aproveitada (FELTES et al., 2010).

Os objetivos deste estudo foram caracterizar o resíduo de tilápia (*Oreochromis niloticus*), avaliando o desempenho de diferentes concentrações de ácidos, visando estabelecer a melhor solução para obtenção do coproduto silagem; verificar a estabilidade das silagens, ao longo do tempo de armazenamento através de análises microbiológicas; e fracionar a silagem avaliando o rendimento das sub-frações.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material

O resíduo de tilápia (*Oreochromis niloticus*) composto por cabeças, vísceras, caudas, pele, espinhas e escamas, foi obtido após a filetagem dos peixes. Foram utilizados 6 kg de resíduo.

4.2.2 Elaboração da Silagem

O resíduo bruto de tilápia foi triturado até a formação de massa homogênea, em triturador, cujas especificações do fabricante são as seguintes: CAF - picador de carne 98 BT parcial inox, motor de 3 CV. Foram preparados diferentes tratamentos com formulações de ácidos, conforme descrito a seguir: ácido cítrico + ácido fórmico na proporção de 1:3, com adição de 3% do volume da solução ácida à massa (T1); ácido propiônico + ácido fórmico na proporção de 1:3, com adição de 3% do volume da solução ácida à massa (T2); e ácido cítrico, com adição de 5% do volume da solução ácida à massa (T3). As soluções foram adicionadas manualmente ao resíduo homogeneizado, em recipientes de vidro sob constante revolvimento, obtendo-se as silagens químicas. Posteriormente, foi feito o controle do pH para que este se mantivesse próximo de 4, utilizando a própria solução acidificante.

4.2.3 Análise de pH e composição centesimal

A determinação do pH foi realizada para as amostras de silagens, segundo Pregolato e Pregolato (1985) a cada 24 horas, até apresentar estabilidade. A análise foi feita em potenciômetro digital, marca Digimed, com os resultados expressos em duas casas decimais. Para a análise da composição centesimal (umidade, proteína, lipídeos e cinza) todas as análises foram realizadas em triplicata de acordo com *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995) para o resíduo bruto. A umidade foi determinada através do método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante. A análise de proteínas foi realizada através do método Micro-Kjeldhal, com digestão em bloco digestor e seguida por destilação no destilador acoplado com posterior titulação com ácido sulfúrico 0,01N. A fração lipídica foi extraída pelo método Soxhlet, utilizando-se como solvente o hexano, seguido de aquecimento em estufa até evaporação total do solvente. O teor de matéria mineral foi medido pelo método gravimétrico, carbonizando-se a amostra em mufla a 550°C. Os resultados foram calculados em base seca e expressos em g 100 g⁻¹.

4.2.4 Análise Microbiológica

A análise microbiológica foi realizada de acordo com Silva et al. (2010), sendo feita a contagem total de aeróbios mesófilos, contagem total de bolores e leveduras e detecção de *Salmonella*. Para a detecção de *Salmonella*, foi empregado um Kit rápido “1-2 test”, fabricado pela Biocontrol/USA. As análises foram realizadas aos 0, 10, 20 e 40 dias de armazenamento das silagens químicas e no resíduo bruto.

4.2.5 Fracionamento da silagem química e rendimento das frações

A silagem com 10 dias de armazenamento foi submetida ao fracionamento, segundo método descrito por Dumay et al. (2006). Realizou-se a centrifugação (Centrífuga refrigerada 5810 R Eppendorf) a 8.500 RPM, a 0 °C e durante 30 minutos. Três fases foram obtidas: sedimento, fase aquosa e fase lipídica, sendo, posteriormente, armazenadas sob congelamento e acompanhadas por observação sensorial visual.

Para o cálculo do rendimento, a silagem química foi pesada antes do fracionamento e, posteriormente, as três fases obtidas foram pesadas individualmente para obtenção do rendimento de cada fração. Os cálculos foram feitos em relação à silagem química.

Os resultados foram expressos em porcentagem da fração lipídica, sedimento e fração aquosa em relação aos coprodutos de origem (FERRAZ DE ARRUDA, 2004).

4.2.6 Avaliação estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio do Software Statistica Version 11. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a fim de observar as diferenças significativas entre os valores médios ($p \leq 0,05$).

4.2.7 Resultados e Discussão

4.2.7.1 Elaboração e estabilidade das silagens

O processo para obtenção de silagem mostrou-se simples e de fácil manuseio, não exigindo equipamentos e procedimentos custosos, sendo, portanto, uma alternativa para obtenção de coprodutos de pescado conforme afirmado por Ferraz de Arruda et al. (2009). O início da liquefação, para os tratamentos T1 e T2, foi observado visualmente no terceiro dia, aumentando de forma gradativa, resultando em um produto liquefeito, de coloração marrom claro e aroma ácido (Figura 4.1). Este aspecto pode ser atribuído à contínua hidrólise proteica, ocasionada pela ação das enzimas proteolíticas, naturalmente presentes no pescado, principalmente nas vísceras, e acelerada pela inclusão dos ácidos que propiciaram as condições adequadas à ação enzimática nos tecidos, e consequente, limitação no crescimento microbiano, conforme descrito por Kompang (1981) e Gildberg (2004). Para o tratamento T3, ao longo do período de observação e período de estabilização do pH, houve a formação de bolhas de gases no interior da mistura, não havendo liquefação e apresentando aroma desagradável. Através de análises microbiológicas pôde ser constatada a presença de Aeróbios Mesófilos e Bolores e Leveduras em números elevados ocasionando assim o seu descarte (Figura 4.1). Diariamente, uma fina camada de óleo se formava na parte superior do produto; essa camada foi sempre revolvida, com o objetivo de colocá-la novamente em contato com o ácido e prevenir a ocorrência de rancidez oxidativa no material, conforme preconizado por Beerli et al. (2004).

Os valores de pH para as silagens estão demonstrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Características físicas das silagens e quantidade de solução acidificante empregada para controle do pH, a temperatura ambiente $25\pm 1^\circ\text{C}$

Silagem	T ($^\circ\text{C}$)	pH _m	pH _f	ácido (mL)
T1	25 ± 1	$3,81 \pm 0,19$	3,93	0
T2	25 ± 1	$3,76 \pm 0,09$	3,73	0
T3	25 ± 1	$3,95 \pm 0,28$	4,31	5

T1 = ácido cítrico: fórmico (1:3) 3% (v/m); T2 = ácido propiônico: fórmico (1:3) 3% (v/m); T3 = ácido cítrico 5% (v/m); pH_m = médias de pH durante período de estabilização; pH_f = pH final após estabilização.

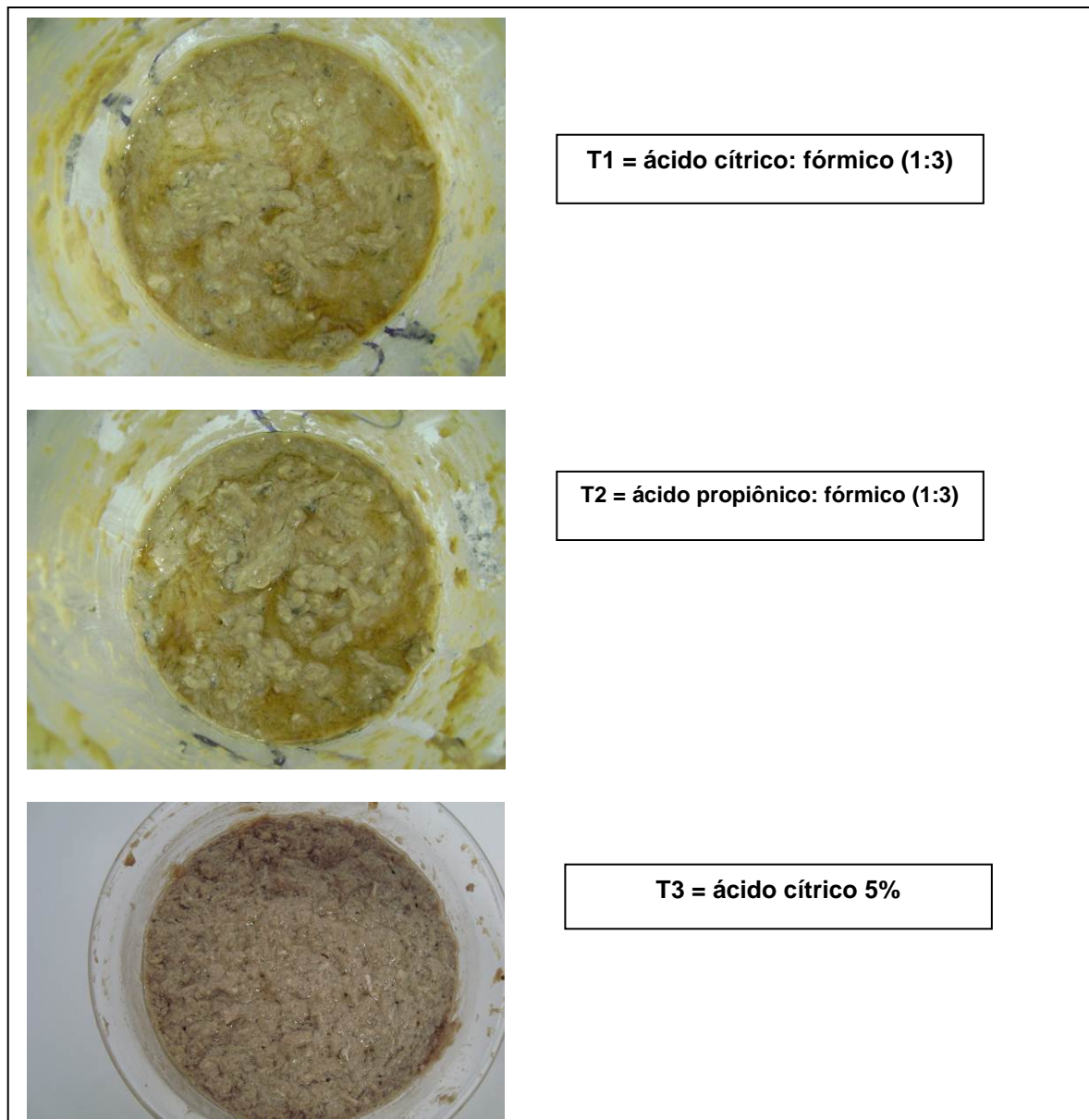


Figura 4.1 – Silagem de resíduo de tilápia após 10 dias a temperatura ambiente

As silagens elaboradas com as soluções de ácido cítrico: fórmico (T1) e propiônico: fórmico (T2) apresentaram valor final para pH de 3,93 e 3,73, respectivamente, revelando que os tratamentos garantiram a qualidade do coproduto, em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Para a silagem elaborada somente com ácido cítrico (T3), observou-se um valor final de pH de 4,31, mostrando que o mesmo não estabilizou, mesmo com a contínua adição de ácido. O pH obtido, inferior a 4,0 para os tratamentos T1 e T2, inibiu o crescimento de bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* e microrganismos putrefativos e patogênicos, e também limitou a possibilidade de desenvolvimento de *Clostridium botulinum* e de *Salmonella sp.*, representando a segurança dos produtos obtidos a partir destas silagens, para uma posterior utilização em alimentação animal (SEIBEL; SOARES, 2003). Não houve crescimento fúngico e a estabilidade foi atingida nos 10º dia de hidrólise para T1 e T2.

O período necessário para atingir a estabilidade das silagens T1 e T2 deve ser atribuído às soluções ácidas utilizadas que, conforme diversos autores já demonstraram anteriormente, permite a produção de silagem estável de forma mais rápida e com pH adequado (BORGHESI; FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2008; FERRAZ DE ARRUDA et al., 2009; KOMPIANG, 1981; LO; LIAO; GAO, 1993; MORALLES-ULLOA; OETTERER, 1995; TATTERSON; WINDSOR, 1974). A silagem com 5% de ácido cítrico não alcançou a estabilidade, após inclusão diária de ácido cítrico, ocorrendo à degradação microbiológica da mesma. A maior necessidade de controle do pH, está em conformidade ao apresentado por Lo, Liao e Gao (1993); estes autores relataram que as silagens elaboradas com 2 e 3% de ácido cítrico apresentaram elevação de pH, não atingindo a estabilidade durante 30 dias.

4.2.7.2 Composição química do resíduo bruto e das silagens

A matéria-prima utilizada para obtenção da silagem apresentou características físico-químicas adequadas, com pH de 6,64, conforme preconizado pela legislação (BRASIL, 1952). Os resultados da composição química (umidade, proteína, lipídeos e cinzas) estão demonstrados na Tabela 4.2. Conforme os resultados encontrados nesta pesquisa, pode-se afirmar que a composição da silagem está diretamente relacionada com o material que lhe deu origem, conforme já apontado em outras pesquisas (BORGHESI et al., 2007; FERRAZ DE ARRUDA; BORGHESI; OETTERER, 2007).

Tabela 4.2 - Composição química do resíduo e das silagens T1, T2 e T3, em g 100g⁻¹ de base seca

Tratamentos	Umidade	Proteína	Lipídeos	Cinzas
Resíduo bruto	58,05 ± 1,07 ^{ab}	12,31 ± 0,37 ^a	10,94 ± 1,21 ^a	5,35 ± 0,40 ^a
T1	60,21 ± 0,14 ^a	13,16 ± 0,16 ^a	14,73 ± 0,33 ^a	4,27 ± 0,63 ^a
T2	56,55 ± 0,96 ^{ab}	14,21 ± 0,09 ^a	9,73 ± 0,64 ^a	5,79 ± 0,04 ^a
T3	55,05 ± 3,33 ^b	11,75 ± 0,14 ^a	9,60 ± 2,89 ^a	3,65 ± 0,35 ^a

T1 = ácido cítrico: ácido fórmico (1:3), 3% v/m de resíduo; T2 = ácido propiônico: ácido fórmico (1:3), 3% v/m de resíduo; T3 = ácido cítrico 5% v/m de resíduo.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

Os teores elevados de cinzas, observados estão diretamente relacionados com a presença de escamas, cabeças, coluna vertebral, ossos e nadadeiras presentes na matéria-prima utilizada para a elaboração das silagens. Também foi elevado o teor de lipídeos nas silagens e no resíduo, semelhante ao encontrado na matéria-prima. Este fato ocorreu devido à constituição física dessa espécie, que apresenta depósitos de gordura nas vísceras, sendo o mesmo observado por Borghesi (2004). Os valores obtidos foram semelhantes aos encontrados por Vidotti e Gonçalves (2006) para a silagem química de tilápia produzida a partir de resíduos de filetagem, quando foram observados valores, em g 100g⁻¹ de matéria seca, de: 68,62 g 100g⁻¹ de umidade, 5,13 g 100g⁻¹ de cinzas, 13,49 g 100g⁻¹ de proteína bruta e 10,85 g 100g⁻¹ de extrato etéreo. Dentre os componentes analisados, destaca-se a fração lipídica, pois o óleo obtido do processo de silagem constitui-se em uma fonte de lipídeos de alta qualidade e baixo custo, além de fonte de energia e ácidos graxos. Porém, a concentração lipídica é considerada um ponto crítico para manutenção da estabilidade e da qualidade nutricional da silagem (FERRAZ DE ARRUDA, 2004).

O valor nutricional da silagem pode ser afetado, negativamente, com o aumento do tempo de estocagem, devido às condições de armazenamento e contaminação prévia da silagem, além da formação, durante o armazenamento, de aminoácidos livres que ficam expostos à presença de alto teor de lipídeos, podendo ocorrer reações de oxidação lipídica, resultando também em alterações de sabor, cor, textura e eventual produção de componentes tóxicos (SALES, 1995). Recomenda-se, portanto, a retirada da fração lipídica e/ou adição de antioxidantes para que se obtenha maior estabilidade. Borghesi, Ferraz de Arruda e Oetterer (2007) sugerem que a análise da composição química da silagem seja realizada antes de seu uso como ingrediente em rações, devido à variada composição da matéria-prima utilizada. Haverá influência da espécie e época do ano na composição da silagem, sendo que a composição aproximada da silagem é semelhante à da matéria-prima.

4.2.7.3 Avaliação microbiológica

Os resultados das análises de Aeróbios Mesófilos e Bolores e Leveduras, estão apresentados na Tabela 4.3. Estas análises foram feitas para caracterização da matéria-prima e posterior monitoramento do comportamento dos ácidos quanto ao poder bactericida/bacteriostático.

Tabela 4.3 - Contagem microbiológica do resíduo e silagens de tilápia, ao longo do tempo de armazenamento a temperatura ambiente $25\pm 1^\circ\text{C}$

Amostras	Aeróbios mesófilos (UFC.g ⁻¹)				Bolors e leveduras (UFC.g ⁻¹)			
	1 dia	10 dias	20 dias	40 dias	1 dia	10 dias	20 dias	40 dias
Resíduo	1x10 ⁵ est	-	-	-	9x10 ³ est	-	-	-
T1	<10	2x10 ² est	8x10 est	1x10 est	< 100	< 100	< 100	< 100
T2	<10	3x10 ² est	1x10 est	<10	< 100	< 100	< 100	< 100
T3	1,2x10 ² est	5,2x10 ⁶ est	-	-	< 100	5,3x10 ⁷ est	-	-

T1 = ácido cítrico: ácido fórmico (1:3), 3% v/m de resíduo; T2 = ácido propiônico: ácido fórmico (1:3), 3% v/m de resíduo; T3 = ácido cítrico 5% v/m de resíduo.

É possível perceber (Tabela 4.3) que, durante o período de estocagem, a silagem química (T1 e T2), apresentou diminuição na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, e bolores e leveduras, demonstrando que logo após o processamento com adição de ácido, os valores decresceram de forma significativa, indicando boas condições gerais do produto armazenado por um longo período de tempo, suficiente para garantir boa estabilidade do produto final. Esses dados corroboram os obtidos por Sales (1995) que salientou o fato de que se a silagem se mantivesse preservada, durante o período de armazenamento com diminuição no crescimento de micro-organismos seria devido, principalmente, à boa qualidade do método empregado e seria de primordial importância, principalmente na alimentação animal.

Na contagem de Aeróbios Mesófilos, que reflete a qualidade da matéria-prima, bem como, as condições de processamento e manuseio; a partir dos 10 dias, o tratamento T3 obteve uma contagem superior ($5,2 \times 10^6$ est (UFC g⁻¹)), comparada aos outros tratamentos, ocasionando seu descarte, pois além desta constatação, houve formação de bolhas de gases no interior da mistura, provocando a não liquefação, aroma desagradável e coloração diferenciada. O mesmo aconteceu na análise de Bolores e Leveduras, o tratamento T3 apresentou contagem superior comparado às outras amostras, $5,3 \times 10^7$ est (UFC g⁻¹).

Não foi observada a presença de *Salmonella* nas amostras de silagem de todos os tratamentos analisados, em 25 g de amostra, indicando que os tratamentos realizados (adição de ácido), não permitiram seu desenvolvimento, pois o ácido assegurou o pH final inferior a 4,0, representando boa qualidade microbiológica no manuseio, sendo este adequado e eficiente, tanto na captura do pescado, quanto na filetagem, pois esses microrganismos não existem originalmente no pescado, sendo introduzidos durante a manipulação ou por contato com águas contaminadas; mas sua presença constitui problema de saúde pública devido ao seu caráter patogênico (BOSCOLO, 2010).

4.2.7.4 Rendimento e avaliação visual das frações

O cálculo de rendimento das frações obtidas pela centrifugação foi realizado com o intuito de dimensionar o conteúdo fracionado das silagens, conseguindo-se obter três fases distintas, sendo a camada superior lipídica, ao centro a fase aquosa e por fim a sedimentada (Figura 4.2). Em ambos os tratamentos a fase lipídica apresentou aparência oleosa e mais

escura, variações que podem ser atribuídas à diversidade na constituição do resíduo, variações sazonais e dietéticas ou estágio de desenvolvimento dos peixes. A fase aquosa portou-se como um líquido amarelado e viscoso, e a fase sedimentada apresentou-se acinzentada e de textura rígida, uma vez que a matéria-prima utilizada continha material ósseo, influenciando assim na coloração observada. Estas observações também foram feitas por Anbe (2011), que realizou experimento com resíduo de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*). A Tabela 4.4 apresenta o rendimento das frações obtidas no tratamento T1 e T2, em porcentagem.

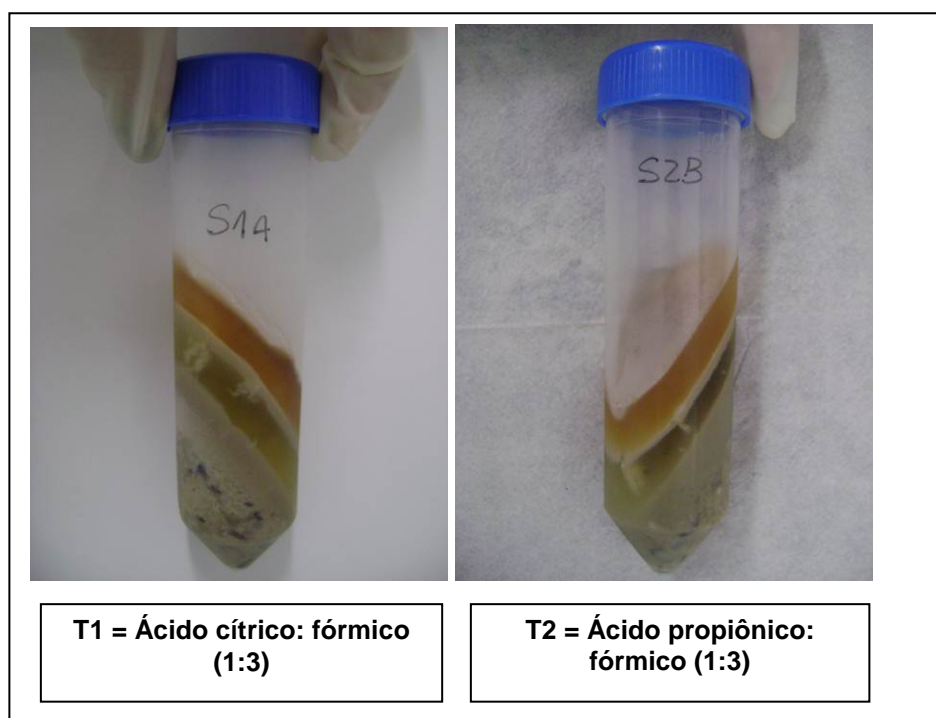


Figura 4.2 – Silagem após centrifugação com separação das fases.

Tabela 4.4. Rendimento das frações obtidas nos tratamentos T1 e T2

Silagem	Fração lipídica (%)	Fração aquosa (%)	Sedimento (%)
T1	18 ± 0,04 ^a	21 ± 0,07 ^a	60 ± 0,06 ^b
T2	17 ± 0,01 ^a	13 ± 0,01 ^b	69 ± 0,01 ^a

T1 = ácido cítrico: ácido fórmico (1:3), 3% v/m de resíduo; T2 = ácido propiônico: ácido fórmico (1:3), 3% v/m de resíduo.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey p<0,05).

Os rendimentos das frações foram semelhantes aos obtidos por Anbe (2011) obtendo três frações após centrifugação da silagem, correspondendo 15,1 % a fração lipídica, 31,8 % a fração aquosa e 53,1 % ao sedimento. Esta autora discutiu que, no caso da matéria-prima conter alta quantidade de lipídeos, ocorre formação do complexo proteína-lipídeo, que apresenta maior resistência à proteólise, levando à menor separação do lipídeo e redução da quantidade de hidrolisado proteico de pescado.

O fracionamento da silagem química possibilita uma posterior averiguação da presença de compostos bioativos nas diferentes frações, de forma isolada, incentivando a sustentabilidade da cadeia produtiva do pescado. Permite também, além da reutilização, agregar valor diante da inclusão desses coprodutos em diferentes setores.

4.3 Conclusões

A utilização de diferentes concentrações de ácidos para obtenção deste coproduto mostrou-se eficiente para os tratamentos com os ácidos cítrico e fórmico, bem como fórmico e propiônico, apresentando estabilidade ao longo de 40 dias de armazenamento à temperatura ambiente, de aproximadamente 25°C.

É possível fracionar este produto, obtendo-se coprodutos que podem ser aplicados na elaboração de diversos ingredientes tanto para alimentação humana ou animal.

O processo de fracionamento permite a remoção da fração lipídica da silagem, o que reflete na maior estabilidade oxidativa desta para ser utilizada na elaboração de outros produtos, como também estabiliza a fração aquosa do interferente na elaboração dos hidrolisados proteicos.

O processo para obtenção das silagens ácidas mostrou-se simples e de fácil manuseio, não exigindo equipamentos e procedimentos custosos, sendo, portanto, uma alternativa para obtenção de coprodutos de pescado.

Referências

ANBE, L. **Prospecção de componentes bioativos em resíduos do processamento do pescado visando à sustentabilidade da cadeia produtiva.** 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BEERLI, E.L.; BEERLI, K.M.C.; LOGATO, P.V.R. Silagem ácida de resíduos de truta (*Oncorhynchus mykiss*), com utilização de ácido muriático. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 195-198, 2004.

BORGHESI, R. **Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BORGHESI, R.; FERRAZ DE ARRUDA, L. F.; OETTERER, M. A silagem de pescado na alimentação de organismos aquáticos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 329-339, 2007.

BORGHESI, R.; PORTZ, L.; OETTERER, M.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 242-248, 2008.

BOSCOLO, W.R.; SANTOS, A.M.; MARTINS, C.V.B.; FEIDEN, A.; BITTENCOURT, F.; SIGNOR, A.A. Avaliação microbiológica e bromatológica da silagem ácida obtida de resíduos da indústria de filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 515-522, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da inspeção industrial sanitária de produtos origem animal (RIISPOA)**. Brasília, DF, 1952. 207 p.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J.P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2327-2332, 2006.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: 2012**. Rome, 2012. 230 p.

FELTES, M.M.C.; CORREIA, J.F.G.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; NINOW, J.L.; SPILLER, V.R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FERRAZ DE ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; OETTERER, M. Fish silage - a review. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 879-886, 2007.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; PORTZ, L.; CYRINO, J.E.P.; OETTERER, M. Fish silage in black bass (*Micropterus salmoides*) feed as an alternative to fish meal. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 5, p. 879-886, 2009.

GILDBERG, A. Enzymes and bioactive peptides from fish waste related to fish silage, Fish Feed and Fish Sauce Production. **Journal of Aquatic Food Product Technology**. London, v. 13, n. 2, p. 3-11, 2004.

KIM, S.K.; CHOI, Y.R.; PARK, P.J.; CHOI, J.H.; MOON, S.H. Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. **Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology**, Seoul, v. 43, p. 225-227, 2000.

KOMPIANG, I.P. Fish silage: its prospect and future in Indonesia. **Indonesia Agricultura Research & Development Journal**, Jakarta, v. 3, n. 1, p. 9-12, 1981.

LO, K.V.; LIAO, P.H.; GAO, Y. Effects of temperature on silage production from salmon farm mortalities. **Bioresource Technology**, Essex, v. 44, n. 1, p. 33-37, 1993.

MAIA, W.M.; NUNES, M.L.; FIGUEIREDO, M.J.; BRAGAGNOLO, N. Caracterização da fração lipídica de silagem de resíduo de tilápia para utilização em rações para a aquicultura. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 10., 1998, Recife. **Anais...** Recife: Persona, 1998. v. 2, p. 55-64.

MORALES-ULLOA, D.F.; OETTERER, M. Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 206-214, 1995.

PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N.P. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 553 p.

RAI, A.K.; SWAPNA, H.C.; BHASKAR, N.; HALAMI, P.M.; SACHINDRA, N.M. Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 46, n. 1, p. 9–13, 2010.

SALES, R.O. **Processamento, caracterização química e avaliação nutricional da silagem da despesca da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em dietas experimentais com ratos**. 1995. 174 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

SEIBEL, N.F.; SOUZA-SOARES, L.A. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 333-337, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; dos SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632 p.

STEVANATO, F.B.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V. Aproveitamento de resíduos, valor nutricional e avaliação da degradação de pescado. **PUBVET**, Londrina, v. 1, n. 7, ed. 6, art. 171, 2007. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigos_imp.asp?artigo=171>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SUCASAS, L.F.A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de coprodutos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva.** 2011. 164 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TATTERSON, J.N.; WINDSOR, M.L. Fish silage. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 25, n. 1, p. 369-379, 1974.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. **Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal.** São Paulo: Instituto de Pesca, 2006. 19 p.

5 ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COPRODUTOS DE RESÍDUOS DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*) E BEIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*).

Resumo

Os objetivos deste estudo foram padronizar o processo de obtenção de silagem de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e de beijupirá (*Rachycentron canadum*), avaliando o rendimento das frações e, caracterizar a composição química e nutricional das silagens químicas e suas sub-frações. Resíduos do processamento de ambas as espécies foram triturados, separadamente, obtendo-se uma massa homogênea. Para elaboração das silagens, foram empregados diferentes tratamentos como ácido cítrico: ácido fórmico; 1:3 e adicionados em 3% v/massa; ácido propiônico: ácido fórmico; 1:3 e adicionados em 3% v/massa, e as mesmas foram armazenadas a temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$) por até 40 dias. Foi realizado o fracionamento das silagens observando os melhores rendimentos, ao longo do tempo de estocagem. As amostras de resíduos e silagens, nos diferentes tratamentos, foram submetidas à análise química para caracterização e avaliação da estabilidade, das frações e prospecção de componentes de interesse nutricional. O pH se manteve próximo de 4, em todos os tratamentos garantindo a estabilidade dos coprodutos durante o armazenamento. Os resultados da composição centesimal demonstraram teores elevados de cinza para todas as amostras, o que está relacionado à presença de escamas, cabeça, coluna vertebral, ossos e nadadeiras na matéria-prima. Os teores de proteínas no resíduo e nas silagens de tilápia apresentaram-se na faixa de 11,11 a 16,66 g.100g⁻¹, e para os de beijupirá 15,63 a 24,25 g.100g⁻¹. Observaram-se nos tratamentos que não receberam o antioxidante BHT, valores elevados para o Índice de peróxidos, indicando que houve um processo de degradação da fração lipídica presente nas silagens e reafirmando a necessidade de se utilizar um aditivo nas formulações. Houve também um aumento gradual de Nitrogênio não proteico durante a hidrólise, ascendendo de forma significativa entre os tempos de armazenamento. Em relação ao rendimento, as silagens demonstraram melhores rendimentos das frações aquosas no período de 10 e 20 dias de estocagem. Para a composição de ácidos graxos, tanto para os resíduos, quanto para as silagens observou-se que o ácido oleico (18:1) apresentou-se em maior quantidade em relação aos demais. A silagem mostrou-se uma alternativa na produção de coprodutos devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados na fração lipídica, aminoácidos nas frações proteicas solúveis e insolúveis e quantidade satisfatória de minerais na fração insolúvel das silagens, tendo grande potencial para vários usos como suplemento alimentar. Este estudo dispõe o procedimento operacional de forma padronizada para elaboração da silagem de resíduos de pescado.

Palavras-chave: resíduo, coprodutos, tilápia, beijupirá, silagem química, ácidos graxos poli-insaturados, aminoácidos, minerais.

Preparation and characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and beijupirá (*Rachycentron canadum*) byproducts.

Abstract

The objectives of this study were to standardize the process for obtaining silage from tilapia (*Oreochromis niloticus*) and beijupirá (*Rachycentron canadum*) processing waste, to evaluate silage fractions yield, and to characterize the chemical and nutritional composition of the silages and their sub-fractions. Processing wastes from both species were ground separately, obtaining a homogeneous mass. Two treatments were applied during silage preparation: citric acid: formic acid 1:3 added in 3% v/m propionic acid: formic acid 1:3 added in 3% v/m. Samples were stored for 40 days at room temperature ($25\pm 1^\circ\text{C}$). After fractioning, silages best yield was monitored over the time of storage. Silages and waste samples from both treatments were submitted to chemical analysis aiming their characterization, stability evaluation, and the prospection of nutritional interest components. The pH was maintained close to four in all treatments, ensuring byproducts stability during their storage. The proximate composition revealed high levels of ash in all samples, which is related to the presence of scales, head, spine, bones and fins in the fish waste. Protein levels for tilapia waste and silages ranged from 11.11 to 16.66 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, and for beijupirá from 15.63 to 24.25 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Treatments without BHT antioxidant showed high peroxide values, indicating that there was a degradation process in the silage lipid fraction. Those results reaffirm the need of using additives in the formulations. During the hydrolysis, there was also a gradual increase of non protein nitrogen with time of storage. With respect to silage yield, the best results for the aqueous fractions were found at 10 and 20 days of storage. The oleic acid (18:1) was the most abundant fatty acid in fish waste and silage. The results proved that silage is an alternative for fish byproducts production due to the presence of polyunsaturated fatty acids in the lipid fraction, amino acids in the soluble and insoluble protein fractions, and satisfactory amount of minerals in the insoluble fraction. Therefore, silages have a great potential for various uses as diet supplements.

Keywords: waste, byproducts, tilapia, Beijupirá, silage, polyunsaturated fatty acids, amino acids, minerals.

5.1 Introdução

Os coprodutos de pescado são cada vez mais vistos como um potencial recurso para obtenção de compostos de interesse para a indústria química, farmacêutica e alimentícia, sendo, no entanto, necessário que sejam caracterizados e disponibilizados. A otimização ou verticalização destes coprodutos, através do fracionamento, possibilitará a obtenção de novas matérias-primas diferenciadas para o desenvolvimento de produtos, constituindo-se em inovação tecnológica.

Segundo a FAO (2014), em 2012 cerca de 21,7 milhões de t de pescado foram destinados a fins não alimentares, dos quais 75% foram submetidos ao processamento para obtenção de farinha e óleo; os restantes 5,1 milhões de t foram utilizados para fins farmacêuticos, ornamentais, entre outros.

O resíduo de pescado é, potencialmente, rico em compostos bioativos, amplamente reconhecidos pelas suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, representando, portanto, fontes naturais destas substâncias. Se for empregada uma tecnologia adequada, o material residual pode ser utilizado como matéria-prima e convertido em produtos comerciais (FERRAZ DE ARRUDA; BORGHESI; OETTERER, 2007).

No Brasil o aproveitamento de resíduos de pescado é insignificante, sendo descartada cerca de 50% da biomassa durante o processamento que emprega a filetagem, como o enlatamento e outras linhas de produção. No Sul do Brasil, aproximadamente, 68% dos resíduos são destinados às indústrias de farinha de peixe, 23% seguem ao aterro sanitário municipal e 9% são despejados diretamente nos rios (STEVANATO, 2007). Por serem resíduos agroindustriais ricos em nutrientes, toda e qualquer técnica que vislumbre seu aproveitamento na alimentação animal ou agrícola torna-se interessante, tendo em vista, que a reciclagem desses nutrientes é recomendável. No caso de não ser possível o aproveitamento desse material *in natura*, técnicas de tratamento devem ser aplicadas com a finalidade de proporcionar transformações vantajosas em suas características químicas ou físicas. O material que não possui qualidade para um destino nobre, como o consumo humano, pode ser utilizado para produção de silagem de pescado, como fertilizante ou como ingrediente para ração animal na aquicultura (SUCASAS, 2011). As alternativas para o aproveitamento dos resíduos do processamento são na forma de hidrolisados proteicos ou silagem, que apresentam teores consideráveis de proteína, peptídeos, aminoácidos livres, além de ácidos graxos da série ômega-3, caracterizando-se como uma boa fonte nutricional (FELTES et al., 2010).

Os valores de pH e Nitrogênio Não Proteico (NNP) geralmente são usados como indicadores de qualidade de silagens de pescado (BATISTA et al., 1989; FAGBENRO; JAUNCEY, 1993; HARDY; MASUMOTO, 1990). A silagem de pescado apresenta problemas com relação à oxidação lipídica durante o armazenamento, pois possui área superficial exposta ao ar, são armazenadas por longos períodos e em condições normais de temperatura ambiente (SALES, 1995). Além disso, o próprio processo incorpora oxigênio ao produto, muitas vezes em quantidades elevadas (GRAY; PEARSON, 1987) acelerando a peroxidação dos lipídeos. Este produto também apresenta níveis elevados de ácidos graxos insaturados, devido à composição do material que lhe dá origem e baixas concentrações de antioxidantes naturais (tocoferóis), tornando-se um produto relativamente instável (EINSET; OLCOTT; STANSBY, 1957).

Durante o processamento da silagem, as enzimas encontradas no músculo hidrolisam as proteínas e o nitrogênio torna-se mais solúvel. Essas proteínas são hidrolisadas para aminoácidos livres, tornando-se mais disponíveis para biossíntese (ESPE; RAA; NJAA, 1989).

Os objetivos deste estudo foram padronizar o processo de obtenção de silagem química de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e de beijupirá (*Rachycentron canadum*), visando aperfeiçoar o processo de fracionamento; avaliar o rendimento das sub-frações das silagens obtidas dos resíduos de tilápia e beijupirá através do fracionamento por centrifugação; caracterizar a composição química e nutricional das silagens químicas e suas sub-frações através da determinação dos aminoácidos presentes nos resíduos, silagens e frações do sedimento e presença de ácidos graxos poli-insaturados da fração lipídica.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Matéria-prima

A matéria-prima para elaboração das silagens foi proveniente das espécies tilápia (*Oreochromis niloticus*) e beijupirá (*Rachycentron canadum*). Os resíduos de tilápia foram fornecidos de uma empresa beneficiadora de tilápia da cidade de Curitiba, PR; e os resíduos de beijupirá de uma empresa de cultivo de Ubatuba, SP.

O resíduo obtido foi constituído de aparas de tecido muscular, cabeças, nadadeiras, carcaças e vísceras que foram descartados durante o processamento. Cada lote de resíduo foi triturado separadamente, até a formação de uma massa homogênea, em triturador cuja

descrição do fabricante é a seguinte: CAF - picador de carne 98 BT parcial inox, motor de 3 CV.

5.2.2 Elaboração de Silagem química

Com as matérias-primas previamente trituradas e divididas em lotes foram testados diferentes tratamentos com formulações de ácidos e que estão descritas na Tabela 5.1. As soluções foram adicionadas manualmente ao resíduo homogeneizado, sob constante revolvimento, obtendo-se as silagens de tilápia (ST) e beijupira (SB), em seguida foi feito o controle do pH para que este permanecesse próximo de 4. A silagem foi mantida a temperatura ambiente durante todo o processo.

Tabela 5.1 - Tratamentos para elaboração da silagem de tilápia e de beijupirá

Tratamento	Descrição
STT1	Silagem de tilápia com adição de Ácido cítrico + Ácido Fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .
STT2	Silagem de tilápia com adição de Ácido propiônico + Ácido fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .
STT3	Silagem de tilápia com adição de Ácido cítrico + Ácido Fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo.
STT4	Silagem de tilápia com adição de Ácido propiônico + Ácido fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo.

continua

	conclusão
SBT1	Silagem de beijupirá com adição de Ácido cítrico + Ácido Fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .
SBT2	Silagem de beijupirá com adição de Ácido propiônico + Ácido fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .
SBT3	Silagem de beijupirá com adição de Ácido cítrico + Ácido Fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo.
SBT4	Silagem de beijupirá com adição de Ácido propiônico + Ácido fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo.

5.2.3 Análise do pH e da composição centesimal

A determinação do pH foi realizada para as amostras de silagens, segundo Pregolato e Pregolato (1985) a cada 24 horas, até a estabilidade do mesmo. A análise foi feita em potenciômetro digital, marca Digimed, com os resultados expressos em duas casas decimais.

Para a análise da composição centesimal (umidade, proteína, lipídeos e cinza) todas as análises foram realizadas em triplicata de acordo com *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995) para o resíduo bruto e silagens. A umidade foi determinada através do método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante. A análise de proteínas foi realizada através do método Micro-Kjeldhal, com digestão em bloco digestor e em seguida destilação no destilador acoplado com posterior titulação com ácido sulfúrico 0,01N. A fração lipídica foi obtida pelo método Soxhlet, utilizando-se como solvente o hexano, seguido de aquecimento em estufa até evaporação total do solvente. O teor de matéria mineral foi medido pelo método gravimétrico, carbonizando-se a amostra em mufla a 550°C. Os resultados foram calculados em base seca e expressos em g 100 g⁻¹.

5.2.4 Análise de Índice de peróxido

Foram realizadas análises de Índice de peróxido nas amostras de silagens, de acordo com *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2003) através da diluição de 5 g de óleo em solução de ácido acético e isoctano (3:2) e adição de solução de iodeto de potássio saturada e água destilada. A titulação foi feita com solução de tiosulfato de sódio e o volume gasto, após a adição de solução de amido 0,1%, forneceu a concentração em peróxido em meq kg⁻¹ de amostra. As análises foram realizadas nos tempos 0, 10, 20 e 40 dias de armazenamento a temperatura ambiente de 25±1°C.

5.2.5 Nitrogênio proteico e nitrogênio não proteico

Foram realizadas análises de Nitrogênio proteico e não proteico (NNP) nas amostras de silagens, de acordo com AOAC (1995). A análise do nitrogênio proteico foi realizada através do método Micro-Kjeldhal, com digestão em bloco digestor e em seguida destilação em destilador acoplado com posterior titulação com ácido sulfúrico 0,01N. A análise de NNP foi realizada através da diluição de amostras secas (0,03 g) em 10 mL de água destilada por 10 minutos, sob agitação. Posteriormente, foram adicionados 10 mL da solução de ácido tricloroacético 20% e o sistema sofreu agitação por mais 10 minutos. As amostras permaneceram sob refrigeração por 3 horas para que houvesse completa precipitação do nitrogênio proteico, sendo filtrada a seguir. Foi realizada a digestão com uma alíquota de 5 mL do filtrado com mistura digestora. A titulação foi feita com solução de ácido sulfúrico 0,02N e o volume gasto forneceu a concentração de nitrogênio não proteico, em porcentagem, em massa seca. As análises foram realizadas nos tempos 0, 10, 20 e 40 dias de armazenamento a temperatura ambiente de 25±1°C.

5.2.6 Fracionamento da silagem química e rendimento das frações

As silagens químicas foram submetidas ao fracionamento segundo método descrito por Dumay et al. (2006). As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada 5810 R Eppendorf, a 8.500 RPM durante 30 minutos a 0°C. Três fases foram obtidas (sedimento, fase aquosa e fase lipídica), sendo, posteriormente, armazenadas sob congelamento (-18°C).

Para o rendimento, as silagens químicas foram pesadas antes do fracionamento e, posteriormente, as três fases obtidas foram pesadas individualmente para obtenção do rendimento de cada fração. Os cálculos foram feitos em relação à silagem química. Os

resultados foram expressos em porcentagem da fração lipídica, da fração aquosa e do sedimento em relação aos coprodutos de origem (FERRAZ DE ARRUDA, 2004).

As análises foram realizadas nos tempos 0, 10, 20 e 40 dias de armazenamento a temperatura ambiente de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.2.7 Composição em ácidos graxos dos resíduos e das frações lipídicas das silagens

5.2.7.1 Esterificação

Os ésteres metílicos foram obtidos, conforme metodologia descrita por Hartman e Lago (1973). No processo de esterificação, o óleo foi extraído segundo método de Folch, Lees e Stanley (1957). No material a ser analisado foi adicionado 5 mL de NaOH metanólico, seguido de aquecimento em chapa a $65 - 70^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. À solução quente foram adicionados 10 mL do reagente de esterificação (solução de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol). Em seguida o material foi retornado ao aquecimento por mais 10 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 10 mL de hexano, foi feita a agitação leve e aguardada a separação de fases. Foi descartada a fase inferior; a fase superior foi filtrada em papel de filtro com sulfato de sódio anidro. As amostras foram armazenadas em frascos âmbar até a leitura em cromatógrafo.

5.2.7.2 Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos foi realizada segundo método Firestone (1998), através de cromatógrafo gasoso (Konic – Modelo HRGC 4000A) com detector de chama, em coluna cromatográfica de sílica fundida-CP Sil 88 Tailor Made FAME (Chrompak) 50m x 0,25mm id, filme 0,2 μm . A cromatografia gasosa foi realizada conforme AOCS (1998) – método Ce 1-62; Ce 1b-89; Ce 1c-89. A temperatura da coluna foi aferida para a faixa de 180°C a 225°C , com taxa de aquecimento de 5°C por minuto, enquanto que a temperatura do detector e do injetor foi fixada em 300 e 270°C , respectivamente. A vazão do gás de arraste (hidrogênio) foi de 0,5 mL/minuto e o volume de injeção de 0,5 μL .

5.2.8 Caracterização dos aminoácidos dos resíduos, das silagens e das frações de sedimento das silagens.

5.2.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises de aminoácidos foram feitas por cromatografia líquida, em colunas de troca catiônica e derivação pós-coluna com ninhidrina, em auto analisador. Para qualificação de aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N com 3% de fenol, por 24 horas, a 110°C (MOORE; STEIN, 1963). O triptofano foi determinado após hidrólise enzimática, com Pronase a 40°C por 24 horas, seguido de reação calorimétrica com 4-dimetil-amino-benzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,2N e leitura a 590 nm (SPIES, 1967). O teor de triptofano foi calculado a partir da curva padrão, segundo Spies (1967).

As silagens foram submetidas às análises de minerais, segundo métodos Abreu, Andrade e Falcão (2006) e *AOAC International* (2000).

5.2.9 Avaliação estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio do *Software Statistica Version 12*. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a fim de observar as diferenças significativas entre os valores médios ($p \leq 0,05$).

5.2.10 Resultados e Discussão

5.2.10.1 Estabilidade do pH das silagens

Os valores de pH, para as silagens de tilápia e beijupirá, ao longo do tempo de armazenamento, estão demonstrados nas Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente.

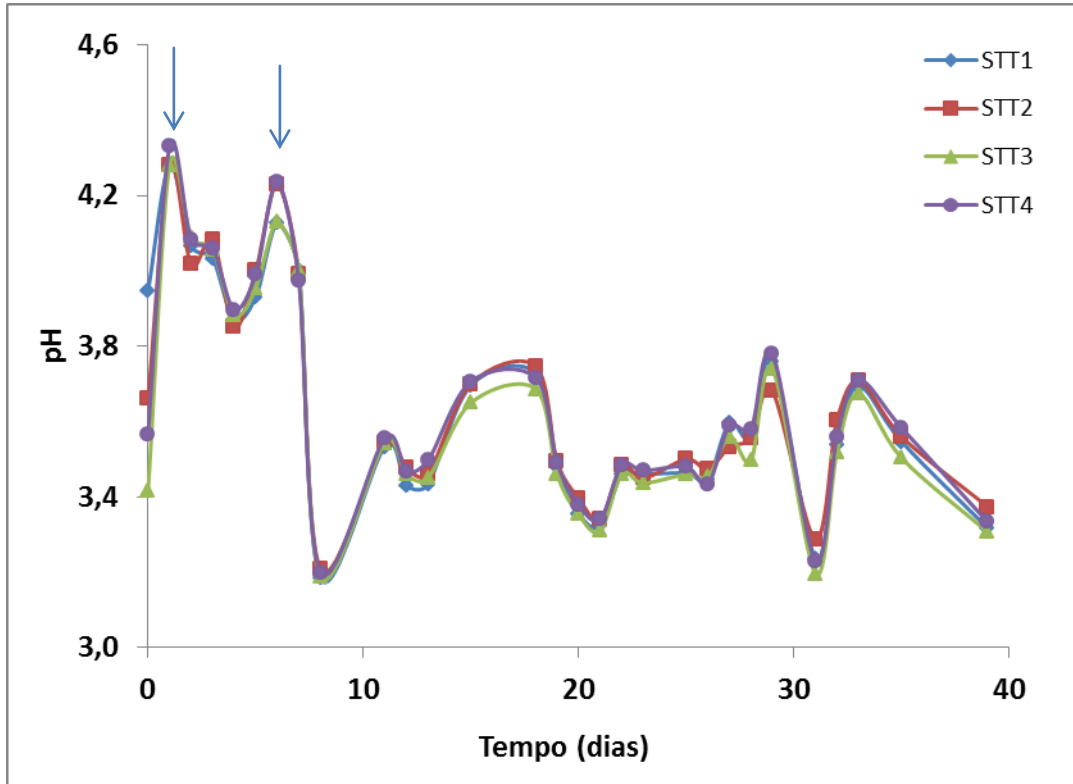


Figura 5.1 - Valores de pH das silagens de tilápia, ao longo do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$)

STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$;
 STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$;
 STT3: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; STT4: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m. Setas azuis na vertical indicam adição da solução de ácidos.

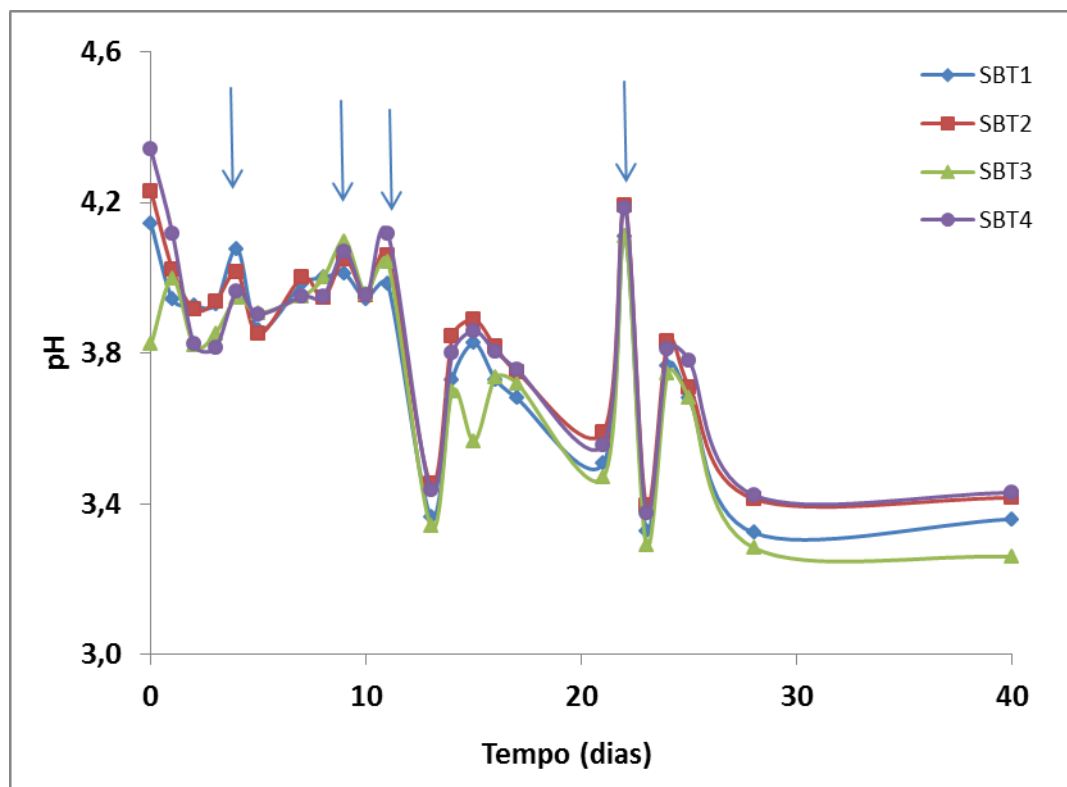


Figura 5.2 - Valores de pH das silagens de beijupirá, ao longo do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$)

SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; SBT3: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; SBT4: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m. Setas azuis na vertical indicam adição da solução de ácidos.

As silagens de tilápia e beijupirá elaboradas com as soluções de ácido cítrico: fórmico, STT1 e STB1, apresentaram valores finais de pH de 3,36 e 3,32, respectivamente. Para as silagens elaboradas com propiônico: fórmico, STT2 e SBT2, os valores finais encontrados foram de 3,37 e 3,42, respectivamente (Figuras 5.1 e 5.2). Estes dados mostram que os tratamentos garantiram a qualidade do coproduto em temperatura ambiente, por um tempo de armazenamento de 40 dias. Beraquet e Galacho (1983) também obtiveram pH na faixa de 3,2 a 3,9 para silagens elaboradas com sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) utilizando formulação semelhante às deste experimento. O mesmo foi observado por Fagbenro e Jauncey (1993) que encontraram valores na faixa de 3,9 a 4,1 para amostras de silagem de tilápia armazenadas a temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) após 30 dias de estocagem.

Esta faixa de pH obtida, inferior a 4 para os tratamentos, inibe o crescimento de bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* e microrganismos putrefativos e patogênicos, e também limita a possibilidade de desenvolvimento de *Clostridium botulinum* e de *Salmonella sp.*, fato que mostra a segurança dos produtos obtidos a partir destas silagens, para uma posterior utilização na alimentação animal (SEIBEL; SOARES, 2003).

O período necessário para atingir a estabilidade das silagens foi de aproximadamente 10 dias, devendo ser atribuído às soluções ácidas utilizadas que, conforme diversos autores já demonstraram anteriormente, permite a produção de silagem estável mais rapidamente e com pH adequado (FERRAZ DE ARRUDA et al., 2009; BORGHESI; FERRAZ DE ARRUDA; OETTERER, 2008; KOMPIANG, 1981; LO; LIAO; GAO, 1993; MORALLES-ULLOA; OETTERER, 1995; TATTERSON; WINDSOR, 1974). A maioria dessas pesquisas aponta a utilização da solução de ácido fórmico: propiônico para elaboração da silagem química de pescado. A presença de ácido orgânico e ácido inorgânico não propicia pH acentuadamente baixo, uma vez que, o uso apenas de ácidos inorgânicos reduz o pH para próximo de 2, necessitando, posteriormente, a realização de uma neutralização do produto (WIGNALL; TATTERSON, 1976). Essa estabilidade do pH também pode ocorrer devido a ação de tamponamento de aminoácidos e outros sais presentes no produto e/ou neutralização parcial do cálcio dos ossos e escamas dos sedimentos de silagem (FAGBENRO; JAUNCEY, 1993).

Para todos os tratamentos, foram necessários adições das soluções ácidas ao longo dos tempos de armazenamentos, para que os mesmos permanecessem com valores inferiores a 4, e assim, garantindo a preservação do coproduto. Os principais pontos de adição das soluções ácidas estão indicados com as setas azuis nas Figuras 5.1 e 5.2. Em média, adicionou-se 5 ml em cada ponto, homogeneizando e monitorando os valores de pH.

5.2.10.2 Composição centesimal do resíduo bruto e das silagens

Os resultados da composição centesimal (umidade, proteína, lipídeos e cinza) para as amostras de resíduos brutos de tilápia e beijupirá e para as silagens, nos diferentes tratamentos, estão demonstrados nas Tabelas 5.2 e 5.3, respectivamente.

Tabela 5.2 - Composição centesimal do resíduo bruto e das silagens de tilápia, nos diferentes tratamentos, em g 100g⁻¹ de massa seca

Tratamentos	Massa Seca	Proteína	Lipídeos	Cinza
Resíduo bruto	43,61±1,72 ^a	14,14±4,39 ^a	44,28±1,39 ^b	13,91±0,57 ^a
STT1	40,92±0,68 ^a	14,43±3,92 ^a	47,50±0,63 ^{ab}	13,73±0,70 ^a
STT2	41,15±1,23 ^a	11,11±5,82 ^a	49,69±1,42 ^a	13,79±2,87 ^a
STT3	43,13±1,86 ^a	11,91±4,79 ^a	48,57±3,21 ^{ab}	13,65±0,43 ^a
STT4	41,12±2,12 ^a	16,66±5,68 ^a	45,38±1,01 ^{ab}	14,33±3,16 ^a

STT1: Silagem de tilápia de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; STT2: Silagem de tilápia de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; STT3: Silagem de tilápia de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; STT4: Silagem de tilápia de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3). Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Tabela 5.3 - Composição centesimal do resíduo bruto e das silagens de beijupirá, nos diferentes tratamentos, em g 100g⁻¹ de massa seca

Tratamentos	Massa Seca	Proteína	Lipídeos	Cinza
Resíduo bruto	35,30±1,48 ^a	23,56±2,17 ^a	44,84±1,73 ^a	10,96±0,54 ^b
SBT1	32,84±3,75 ^a	23,70±1,45 ^a	38,55±3,37 ^b	7,52±0,52 ^c
SBT2	34,88±1,21 ^a	18,26±1,22 ^a	45,25±0,72 ^a	15,45±1,24 ^a
SBT3	38,18±3,15 ^a	15,63±1,08 ^a	46,71±1,64 ^a	15,57±2,31 ^a
SBT4	33,46±1,36 ^a	24,25±3,95 ^a	44,56±2,02 ^a	7,56±0,52 ^c

SBT1: Silagem de beijupirá de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT2: Silagem de beijupirá de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT3: Silagem de beijupirá de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; SBT4: Silagem de beijupirá de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3). Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Os valores para a composição centesimal das silagens de tilápia, em g 100g⁻¹ de matéria seca, não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) em relação à composição da matéria-prima utilizada, exceto para lipídeos (Tabela 5.2). Os valores obtidos foram diferentes dos encontrados por Vidotti (2006) para a silagem química de tilápia produzida a partir de resíduos de filetagem, que relatou valores, em g 100g⁻¹ de matéria seca, de 68,62 g 100g⁻¹ de umidade, 5,13 g 100g⁻¹ de cinzas, 13,49 g 100g⁻¹ de proteína bruta e 10,85 g 100g⁻¹ de extrato etéreo. Essa diferença pode ser atribuída à variação de uma espécie para outra e até dentro da

mesma espécie, dependendo da época do ano, tipo de alimentação, grau de maturação gonadal e sexo. Diferentes espécies de pescado e o tipo de músculo, branco ou escuro, também podem ser os responsáveis pelos diferentes valores de proteína (DISNEY; HOFFMAN, 1978; LANTZ, 1966; MAI et al., 1980; SALES, 1995; SHARDA; MAHAN; WILSON, 1976; TATTERSON; WINDSON, 1974).

O elevado teor de lipídeos pode ser devido à constituição física do material, compreendida por grande quantidade de vísceras, local de depósito de gorduras na tilápia, sendo o mesmo observado por Borghesi (2004). Dentre estes componentes, a fração lipídica é de importância para este estudo, pois o óleo obtido do processo de silagem constitui-se numa fonte de lipídeos de alta qualidade e baixo custo, podendo ser considerada uma excelente fonte de energia, vitaminas A e D e ácidos graxos poli-insaturados ômega-3. Porém, a concentração lipídica é considerada um ponto crítico para manutenção da qualidade nutricional da silagem (FERRAZ DE ARRUDA, 2004). O valor nutricional da silagem pode ser afetado, negativamente, com o aumento do tempo de estocagem, devido às condições de armazenamento e possível contaminação prévia da silagem, além da formação de quantidade significativa de ácidos graxos livres que ficam expostos, ocasionando o processo de oxidação lipídica, resultando também em alterações de sabor, cor e textura (SALES, 1995). Recomenda-se, portanto, a retirada da fração lipídica e/ou adição de antioxidantes para que se obtenha maior estabilidade. Borghesi, Ferraz de Arruda e Oetterer (2007) sugerem que a análise da composição química da silagem seja realizada antes de seu uso como ingrediente em rações, devido à grande variação de composição da matéria-prima utilizada, uma vez que a composição aproximada da silagem é semelhante à da matéria-prima, apesar das alterações nas estruturas física e química das espécies, o que pode ser observado nesta pesquisa.

Os teores elevados de cinza, observados nas silagens ácidas de tilápia de todos os tratamentos estão diretamente relacionados com a presença de escamas, cabeça, coluna vertebral, ossos e nadadeiras, conforme a matéria-prima utilizada para a elaboração da mesma (Tabela 5.2). Com isso pode-se associar a presença de minerais como cálcio e fósforo nas silagens, sabendo-se que estes minerais se acumulam principalmente no esqueleto e escamas. Justifica-se o teor de cinza à porção óssea do pescado em teores significativos, mas também podem ser explicados pela presença de escamas como fontes de minerais no material residual (SMITH, 1977).

Os valores para a composição centesimal das silagens de beijupirá, em $g\ 100g^{-1}$ de matéria seca, apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) em relação à composição de lipídeos e cinza da matéria-prima utilizada para os tratamentos (Tabela 5.3). O mesmo foi observado

quanto ao elevado teor de lipídeos encontrados, sendo mais uma vez indicação da constituição física do material (BORGHESI, 2004). Também se observaram elevados teores de cinza, relacionando-se com a presença de quantidade significativa de escamas, coluna vertebral, ossos e nadadeiras presentes na matéria-prima utilizada para a elaboração do produto.

Comparando-se os resultados encontrados nessa pesquisa, tanto para silagens de tilápia, quanto para silagens de beijupirá (Tabelas 5.2 e 5.3), pode-se afirmar que a composição das silagens é diretamente relacionada com o material que lhe deu origem, sendo que para uma possível utilização industrial, seria necessário realizar avaliação da composição da silagem produzida para padronização.

5.2.10.3 Análise de Índice de Peróxido

A silagem de pescado apresenta problemas com relação à oxidação lipídica durante o armazenamento, pois possui área superficial exposta ao ar, são armazenadas por longos períodos e em condições normais de temperatura ambiente (SALES, 1995). Além disso, o próprio processo incorpora oxigênio ao produto levando à peroxidação dos lipídeos ou acelerando-a (GRAY; PEARSON, 1987). Este produto também apresenta níveis relativamente altos de ácidos graxos insaturados, devido à composição do material que lhe dá origem e baixas concentrações de antioxidantes naturais, tornando-se um produto relativamente instável (EINSET; OLCOTT; STANSBY, 1957).

Foi realizado um acompanhamento da estabilidade das silagens elaboradas, através da realização das análises de Índice de peróxido (IP). Os valores para as silagens de tilápia e beijupirá, ao longo do tempo de armazenamento, estão demonstrados nas Figuras 5.3 e 5.4, respectivamente.

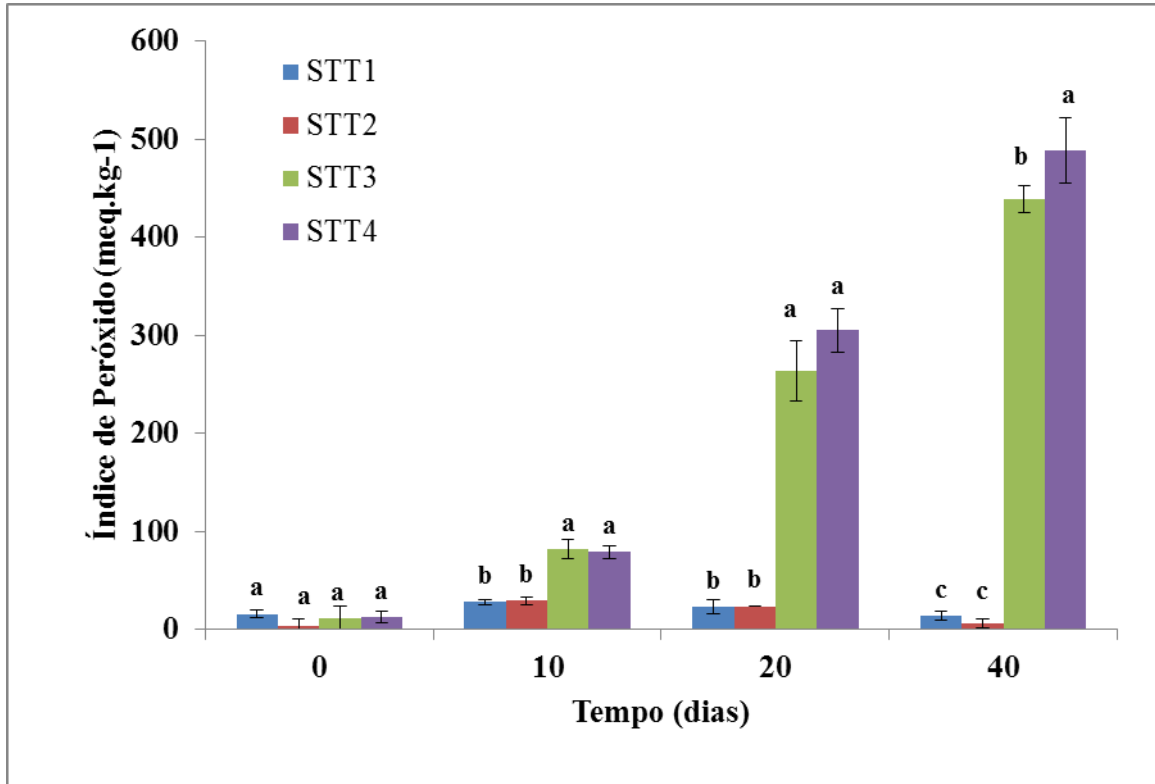


Figura 5.3 - Índice de peróxido das silagens de tilápia, ao longo do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$)

STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; STT3: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; STT4: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m. Valores representam as médias \pm desvio padrão ($n=3$). Médias seguidas de letras diferentes, em cada ponto de armazenamento, são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

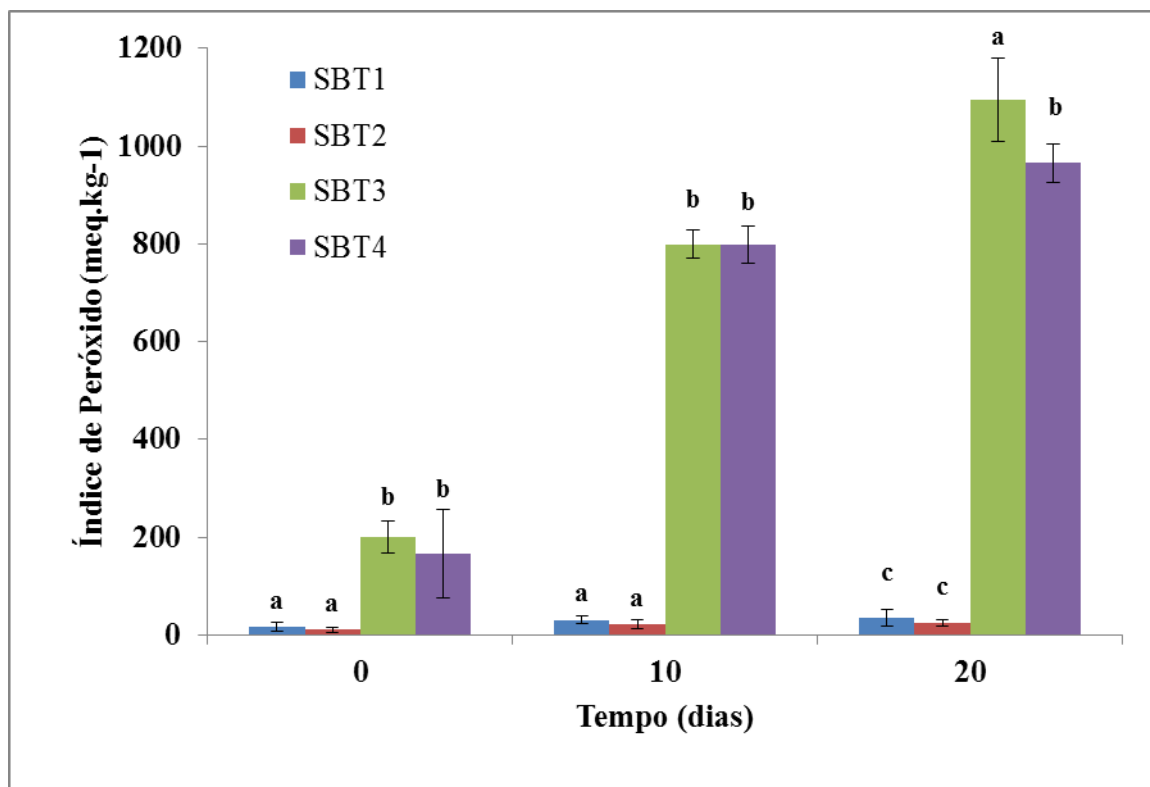


Figura 5.4 - Índice de peróxido das silagens de beijupirá, ao longo do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$).

SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; SBT3: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; SBT4: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m. Valores representam as médias \pm desvio padrão ($n=3$). Médias seguidas de letras diferentes, em cada ponto de armazenamento, são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p<0,05$)

Para a fração lipídica os resultados de IP demonstraram que ao longo do tempo de armazenamento ocorreram degradações desta fração para os tratamentos STT3, STT4, SBT3 e SBT4 (Figuras 5.3 e 5.4). Isto ocorreu devido a não adição de um antioxidante durante a elaboração destas silagens, como por exemplo, o BHT, sendo este necessário para conservação desta fração. Outra forma de se preservar a silagem, e sua fração lipídica, seria retirar esta fração do sistema, conservando os compostos presentes nesta. Os valores obtidos para os tratamentos STT1, STT2, SBT1 e SBT2 foram, em média, valores inferiores a 30 miliequivalente de peróxidos por quilograma de gordura (Figuras 5.3 e 5.4), demonstrando que a adição do antioxidante se faz necessário para preservação do produto.

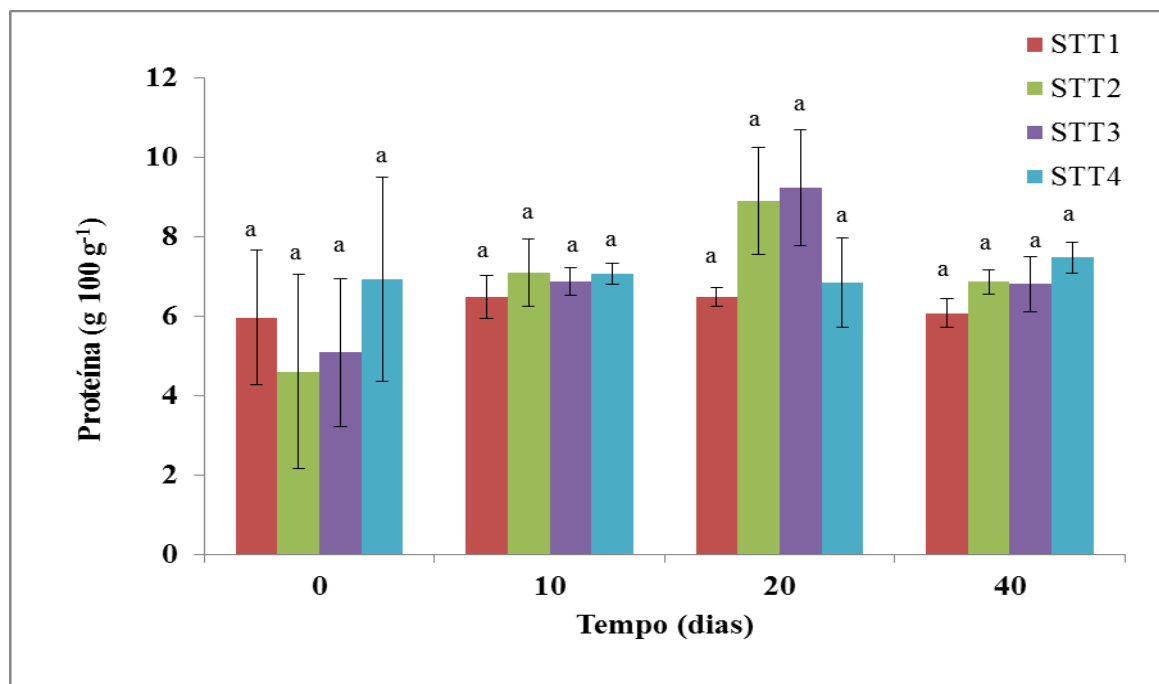
Estudos realizados por Seibel e Souza-Soares (2003), que elaboraram silagem de peçada foguete (*Cynoscion guatucupa*) com ácido acético glacial 15%, utilizando BHT como antioxidante, não detectaram valores de IP para as amostras analisadas com 25 dias de armazenamento. O mesmo foi observado por Ferraz de Arruda (2004) para as amostras de óleo, extraídos por centrifugação, da silagem de tilápia (*Oreochromis niloticus*) elaborada com ácido propiônico: fórmico (1:1) 3%, apresentando valores de IP não detectáveis, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa, onde os tratamentos que receberam o antioxidante BHT (STT1, STT2, SBT1 e SBT2) tiveram a fração lipídica extraída por centrifugação e apresentaram valores relativamente baixos de concentração de hidroperóxidos. Em produtos marinhos, valores de peróxidos de 25 a 30 meqO₂ kg de gordura⁻¹ são considerados aceitáveis (LOVERN, 1962).

Na literatura consultada, pouco consta a respeito dos antioxidantes que devem ser empregados na elaboração das silagens de qualquer espécie de pescado, sendo indicados BHT (hidroxibutilanisol) como o antioxidante mais eficiente em gorduras animais (BOBBIO; BOBBIO, 2001; FERRAZ DE ARRUDA, 2004).

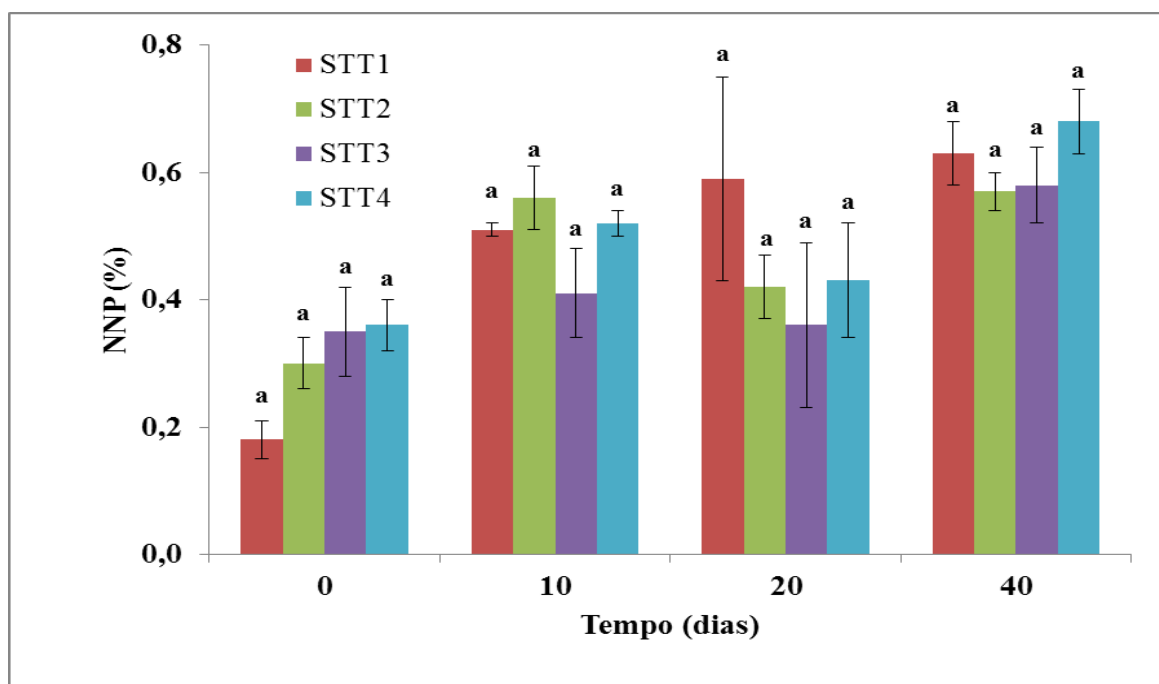
5.2.10.4 Nitrogênio proteico e nitrogênio não proteico

Os valores de Nitrogênio Não Proteico (NNP) geralmente são aceitos e usados como indicadores de qualidade de silagens de pescado (BATISTA et al., 1989; FABERGO; JAUNCEY, 1993; HARDY; MASUMOTO, 1990).

Foi realizado um acompanhamento da estabilidade das silagens elaboradas através da realização das análises de NNP. Nas Figuras 5.5 e 5.6, podem ser observados os valores de NNP das silagens de tilápia e de beijupirá, respectivamente, ao longo de 40 dias de armazenamento.



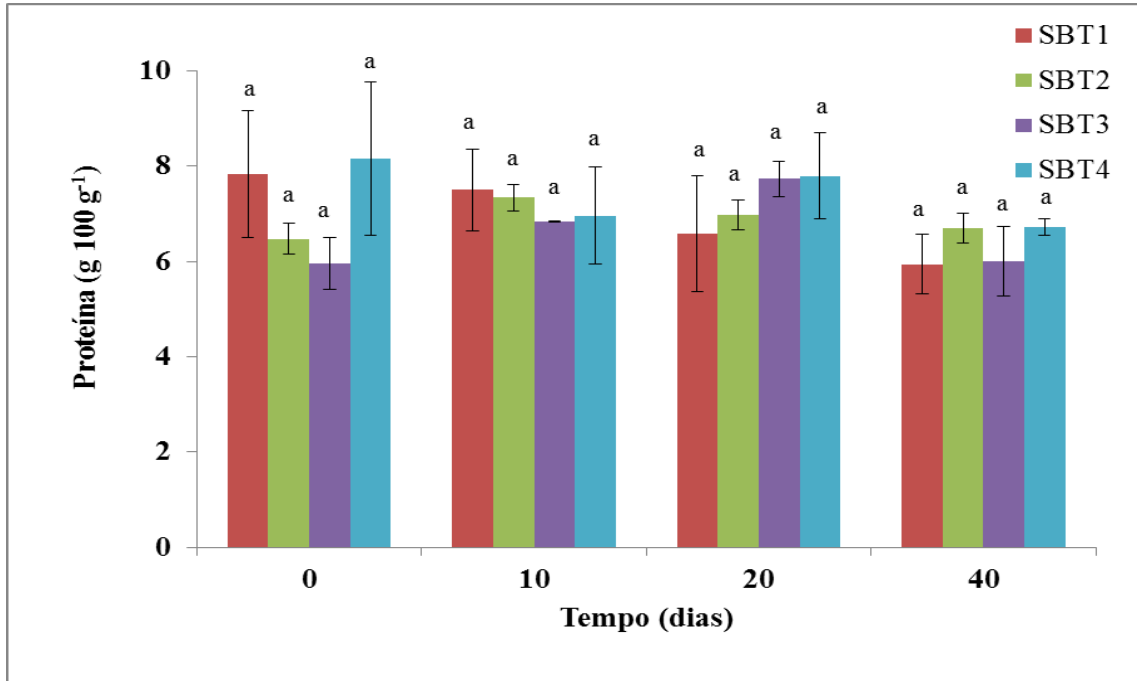
(a)



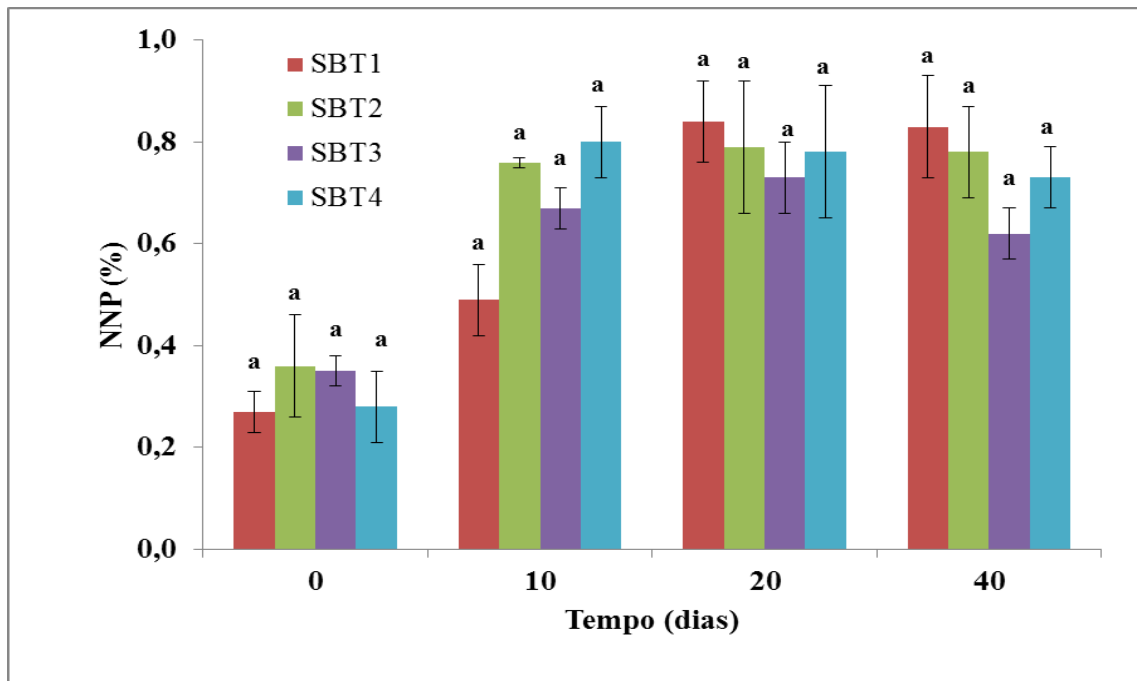
(b)

Figura 5.5 - Nitrogênio proteico (a) e Não Proteico (NNP) (b) das silagens de tilápia, ao longo do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$)

STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; STT3: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; STT4: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m; Valores representam as médias \pm desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras diferentes, em cada ponto de armazenamento, são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).



(a)



(b)

Figura 5.6 - Nitrogênio proteico (a) e Não Proteico (NNP) (b) das silagens de beijupirá, ao longo do tempo de armazenamento, a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$)

SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$; SBT3: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m; SBT4: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m. Valores representam as médias \pm desvio padrão ($n=3$). Médias seguidas de letras diferentes, em cada ponto de armazenamento, são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p<0,05$).

Para ambas as espécies, os valores de NNP aumentaram notoriamente ao longo do tempo de armazenamento, para todos os tratamentos (Figuras 5.5 e 5.6). Isto indica que a proteína foi hidrolisada, conduzindo à liberação de aminoácidos e outros metabólitos (FAID et al., 1997). Estes autores observaram, para amostras de silagem de sardinha (*Sardinha pilchardus*), que os valores de NNP aumentaram notoriamente ao longo do tempo de estocagem, apresentando-se em média de 1,3 % ao final de 15 dias de estocagem, corroborando com os resultados observados neste estudo. O mesmo ocorreu nos estudos realizados por Santana-Delgado, Avila e Stelo (2008) com silagem de cavala espanhola (*Scomberomorus maculatus*), quando os valores de NNP aumentaram 85% em relação ao valor original de nitrogênio total, em 96 horas do processo de silagem a temperatura ambiente ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$), mostrando que o processo de hidrólise das proteínas ocorreu ao longo do tempo nas amostras analisadas.

Para Hall et al. (1985) as mudanças nos valores de NNP se mostraram rápidas nos primeiros dias e em seguida se tornaram mais lentas, demonstrando ser o padrão típico da liberação do nitrogênio. O mesmo foi observado neste experimento, onde os valores de NNP, nos primeiros dias, aumentaram em relação aos demais períodos de estocagem (Figuras 5.5 e 5.6).

Pode-se observar que durante a hidrólise, a elevação dos teores de NNP para as amostras de silagem de tilápia (STT1, STT2, STT3 e STT4), com quarenta dias de armazenamento, variou de 7,72 a 9,4%. Para as amostras de silagem de beijupirá, (SBT1, SBT2, SBT3 e SBT4), os valores se encontraram na faixa de 9,36 a 12,26% para o mesmo período (Figuras 5.5 e 5.6). A passagem do nitrogênio proteico a não proteico é fundamental para se aferir o grau de hidrólise ocorrida no estudo.

A extensão da autólise de diferentes partes do pescado está relacionada com o tipo de material utilizado, se peixe inteiro ou em partes. No processo de acidificação da silagem as proteínas são degradadas a peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres pela ação de enzimas naturalmente presentes no pescado (MAIA, 1998). Green (1984) relata que o NNP não é indicado como índice para avaliação do frescor, mas que sua determinação resulta em um indicador das condições de conservação do produto, assim como, do tempo de armazenamento.

5.2.10.5 Caracterização de aminoácidos dos resíduos e das silagens

Durante o processamento da silagem, as enzimas encontradas no músculo hidrolisam as proteínas e o nitrogênio torna-se mais solúvel. Essas proteínas são hidrolisadas a aminoácidos livres, tornando-se mais disponíveis para biossíntese (ESPE; RAA; NJAA, 1989). Entretanto, a composição de aminoácidos livres no pescado, tem mostrado variar conforme a estação do ano, principalmente, com relação à glicina, ácido glutâmico e taurina (JONES, 1959; WEE; KERDCHUEN; EDWARDS, 1986).

A Tabela 5.4 apresenta os teores de aminoácidos dos resíduos e das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, com 10 dias de estocagem.

Tabela 5.4 – Aminoácidos presentes nos resíduos e nas silagens química de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, com 10 dias de estocagem, comparando padrão da FAO, em g 100g⁻¹

Aminoácidos	RT	RB	STT1	STT2	SBT1	SBT2	FAO*
Alanina	0,94	1,00	0,81	0,78	1,17	1,03	-
Arginina	0,84	0,92	0,74	0,72	1,07	0,95	5,00
Ác. Aspártico	0,51	1,01	0,71	0,76	0,96	0,77	-
Glicina	1,56	1,45	1,11	1,01	1,95	1,71	-
Isoleucina	0,38	0,47	0,46	0,45	0,52	0,48	4,00
Leucina	0,71	0,85	0,79	0,80	0,89	0,84	7,00
Ác. Glutâmico	1,21	1,80	1,42	1,52	1,92	1,68	-
Lisina	0,88	1,08	0,96	0,97	1,13	1,02	5,50
Cistina	0,11	0,12	0,14	0,19	0,18	0,15	-
Metionina	0,27	0,34	0,29	0,27	0,38	0,40	3,50
Fenilalanina	0,43	0,53	0,50	0,50	0,55	0,54	6,00**
Tirosina	0,31	0,41	0,38	0,41	0,56	0,52	
Treonina	0,43	0,50	0,45	0,44	0,55	0,50	4,00
Triptofano	n.d.***	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,00
Prolina	0,96	0,90	0,72	0,66	1,18	1,03	-
Valina	0,57	0,71	0,62	0,63	0,77	0,69	5,00
Histidina	0,21	0,27	0,26	0,23	0,28	0,26	2,00
Serina	0,47	0,57	0,49	0,48	0,65	0,58	-
Taurina	0,07	0,09	0,11	0,11	0,13	0,11	-
Proteínas Totais	14,78	14,49	14,07	14,67	16,99	15,94	

RT: Resíduo bruto de tilápia; RB: Resíduo bruto de beijupirá; STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT1: Silagem de beijupirá de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹

*Fonte: FAO (1985).

**Soma de Fenilalanina + Tirosina

*** n.d. = não detectado.

Valores representam as médias, sendo n=3.

De acordo com a Tabela 5.4, observa-se que o ácido glutâmico, a glicina, a alanina e a lisina são os aminoácidos encontrados em maiores quantidades para os resíduos e para as silagens elaboradas nesta pesquisa. O mesmo foi observado por Borghesi, Ferraz de Arruda e Oetterer (2008); Ferraz de Arruda et al. (2006) e Vidotti, Viegas e Carneiro (2003) para silagens produzidas a partir de diferentes matérias-primas. Para Anbe (2001), as silagens elaboradas com resíduos de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) possuem maiores teores de ácido glutâmico e glicina e menores teores de triptofano, cistina, taurina e metionina, corroborando com os resultados deste experimento.

Stone e Hardy (1986) evidenciaram que entre 3 e 7 dias de ensilagem, ocorre uma intensa proteólise, sendo uma parcela da proteína convertida em peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres havendo a liberação de arginina e lisina. Connell e Howgate, em 1959, afirmaram que o músculo do peixe possui, ocasionalmente, maiores teores de lisina e histidina, e menores teores de metionina, triptofano, fenilalanina e isoleucina do que outros tecidos musculares.

Com relação aos aminoácidos essenciais os resíduos e as silagens elaboradas apresentaram valores menores que o padrão da FAO (1985) (Tabela 5.4). Os valores mais elevados para os aminoácidos essenciais foram para alanina e lisina, corroborando com os resultados encontrados por Morales-Ulloa e Oetterer (1997) em ensilados de sardinha (*Sardinella brasiliensis*). Do ponto de vista nutricional da silagem, o mais importante são os níveis de lisina, cistina e metionina (MAIA, 1998; STROM; EGGUM, 1981).

Os aminoácidos são relativamente estáveis na silagem de pescado. A tirosina se separa da fase aquosa por cristalização e a metionina é estável em meio ácido (JACKSON; KERR; COWER, 1984; MAIA, 1998). Neste experimento, observa-se que os aminoácidos histidina, tirosina e metionina apresentaram-se em quantidade menores ao padrão da FAO (1985). O triptofano não foi detectado, corroborando com Strom e Eggum (1981), Espe, Raa e Njaa (1989), Vidotti, Viegas e Carneiro (2003) e Ferraz de Arruda et al. (2006). Assim como observado por Jackson, Kerr e Cower (1984) o teor de triptofano foi menor em relação aos outros aminoácidos, pois este aminoácido tende a se decompor nas silagens ácidas (BACKOFF, 1976; RAA; RAA; GILDBERG, 1982; STROM; EGGUM, 1981).

5.2.10.6 Rendimento das frações

As Tabelas 5.5 e 5.6 apresentam o rendimento das frações para silagens de tilápia e beijupirá, respectivamente, obtidas por diferentes tratamentos.

Tabela 5.5 – Rendimento das frações obtidas das silagens de tilápia, nos diferentes tratamentos, ao longo do tempo de armazenamento, em porcentagem

Tratamento	Tempo (dias)	FA (%)	FL (%)	SD (%)
STT1	0	24,00±0 ^b	17,67±1 ^a	57,67±1 ^{cd}
	10	31,38±1 ^a	18,00±2 ^a	49,33±1 ^f
	20	28,33±6 ^{ab}	20,67±8 ^a	52,67±5 ^{ef}
	40	24,33±1 ^b	8,67±1 ^b	66,67±1 ^b
STT2	0	27,00±1 ^{ab}	17,68±0 ^a	55,00±1 ^{cde}
	10	25,67±1 ^{ab}	16,67±3 ^a	56,00±2 ^{cd}
	20	23,00±0 ^b	17,00±0 ^a	59,00±0 ^c
	40	00,00±0 ^c	8,67±1 ^b	90,33±1 ^a
Nível de significância		0,0000*	0,0500*	0,0000*

FA = Fração aquosa; FL = Fração lipídica; SD = Fração sedimento; STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Tabela 5.6 – Rendimento das frações obtidas das silagens de beijupirá, nos diferentes tratamentos, ao longo do tempo de armazenamento

Tratamento	Tempo (dias)	FA (%)	FL (%)	SD (%)
SBT1	0	18,33±4 ^e	18,00±6 ^{ab}	63,00±10 ^a
	10	45,00±1 ^{cd}	10,67±0 ^{bc}	43,67±2b ^c
	20	54,00±1 ^a	7,67±0 ^c	37,67±2b ^c
	40	57,33±1 ^a	7,67±1 ^c	34,00±2 ^c
SBT2	0	13,33±3 ^e	22,00±1 ^a	64,33±1 ^a
	10	40,67±2 ^d	13,33±2b ^c	47,00±5 ^b
	20	48,00±1 ^{bc}	10,00±1b ^c	40,33±5b ^c
	40	53,33±1 ^{ab}	9,67±1 ^c	36,00±1b ^c
Nível de significância		0,0500*	0,0500*	0,0000

FA = Fração aquosa; FL = Fração lipídica; SD = Fração sedimento; SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3).

Médias das colunas seguidas de letras diferentes são significativas em nível de 5% (Teste de Tukey $p < 0,05$).

O cálculo de rendimento das frações obtidas pela centrifugação foi realizado com o intuito de dimensionar o conteúdo fracionado das silagens, conseguindo-se obter três fases distintas, sendo a camada superior lipídica, ao centro a fase aquosa e por fim a sedimentada. A liquefação da silagem facilitou a separação mecânica por centrifugação, podendo isolar as camadas facilmente. Em ambos os tratamentos, a fase lipídica apresentou aparência oleosa e mais escura, podendo ser atribuída à diversidade na constituição do resíduo, variações sazonais, dietéticas ou estágio de desenvolvimento dos peixes. A fase aquosa mostrou-se um líquido amarelado e pegajoso, e a fase sedimentada de forma rígida, acinzentada e depositada no fundo do recipiente, devido à matéria-prima utilizada, que contém material ósseo, influenciando assim na coloração observada. Isto foi observado também por Anbe (2011), que realizou experimento com resíduo de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*).

Os maiores valores para a fração aquosa, de maior interesse neste experimento, foram observados a partir do décimo dia para as amostras de silagem de tilápia (STT1 e STT2) e a partir do vigésimo dia para as amostras de silagens de beijupirá (SBT1 e SBT2).

Para as demais frações (lipídicas e sedimento), os valores apresentaram-se maiores no início do período de estocagem (Tabela 5.5 e 5.6). Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Anbe (2011) que realizou experimento com resíduo de sardinhas (*Sardinella brasiliensis*), separando três frações após centrifugação da silagem, sendo 15,1 % da fração lipídica, 31,8 % da fração aquosa e 53,1 % de sedimento. O mesmo foi observado por Raghunath e McCurdy (1987) estudando a silagem elaborada com os ácidos fórmico e propiônico de resíduos de diferentes espécies quando constatou a presença de quatro fases no fracionamento da silagem, a camada de óleo, a camada de emulsão, a fase aquosa e o sedimento. O rendimento da fração aquosa dessa silagem mostrou-se em 67,4%, corroborando com os valores encontrados nesta pesquisa.

Para hidrólise proteica de resíduos de pescado, destaca-se o fato de que as enzimas endógenas agem no processo de hidrólise e, dependendo do uso final do coproduto, é necessário cessar a autólise para que não ocorra desnaturação proteica. Esse processo de desnaturação causa resistência das proteases, pela interação hidrofóbica entre os peptídeos ou a associação entre eles, reduzindo a capacidade das enzimas em hidrolisar a proteína, com consequente diminuição do rendimento do hidrolisado proteico de pescado (MOHR, 1977).

O processo de fracionamento permite a remoção da fração lipídica da silagem, o que reflete na maior estabilidade oxidativa dos produtos que recebem sua inclusão. O fracionamento da silagem química possibilita uma posterior averiguação da presença de compostos de interesse nutricional e as aplicações destas frações, de forma isolada, incentivando a sustentabilidade da cadeia produtiva do pescado. Permite também, a reutilização e agregação de valor diante da inclusão desses coprodutos em diferentes setores.

A avaliação do rendimento, nos diferentes períodos de estocagem, auxiliou na definição de qual o melhor período para se realizar o fracionamento, no caso, entre o décimo até o vigésimo dia de estocagem. Há poucas pesquisas a respeito do fracionamento de silagens e de separação das diferentes fases com elaboração de coprodutos, por isso a importância de se estudar, separadamente, as frações obtidas com este processo.

5.2.10.7 Caracterização da fração lipídica das silagens

A Tabela 5.7 apresenta os ácidos graxos presentes nos resíduos e nas frações lipídicas das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, obtidas por centrifugação.

Tabela 5.7 - Composição de ácidos graxos dos resíduos brutos e das frações lipídicas após fracionamento das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, em g 100g⁻¹

Ácidos graxos	Resíduos			Frações lipídicas		
	RT	RB	STT1	STT2	SBT1	SBT2
Ác. Láurico (C12)	0,02	0,02	0,06	0,08	0,08	0,03
Ác. Mirístico (C14:0)	0,87	0,49	2,65	2,61	2,30	2,46
Ác. Pentadecanóico (C15:0)	0,04	0,07	0,23	0,22	0,44	0,34
Ác. Palmítico (C16:0)	6,69	4,19	23,13	23,14	24,39	23,95
Ác. Margárico (C17:0)	0,08	0,09	0,34	0,33	0,54	0,43
Ác. Esteárico (C18:0)	1,84	0,85	4,35	4,41	5,60	5,11
Ác. Araquídico (C20:0)	0,04	0,05	0,27	0,29	0,23	0,26
Ác. Heneicosanóico (C21:0)	0,01	0,01	0,05	0,04	0,05	0,05
Ác. Behênico (C22:0)	0,02	0,03	0,12	0,12	0,18	0,15
Ác. Tricosanóico (C23:0)	0,01	n.d.*	0,04	0,04	0,02	0,03
Ác. Lignocérico (C24:0)	n.d.	0,01	0,03	0,03	0,07	0,04
Ác. Miristoleico (C14:1)	0,05	0,01	0,16	0,13	0,05	0,10
Ác. Palmitoleico (C16:1)	1,68	1,41	6,35	6,29	7,90	7,12
Ác. Oléico (C18:1n9c)	8,89	2,86	31,86	31,84	19,69	26,80
Ác. Cis-Eicosenóico (C20:1)	0,47	0,09	1,41	1,40	0,61	1,11
Ác. Eurico (C22:1n9)	0,03	0,07	0,20	0,14	0,52	0,29
Ác. Nervonico (C24:1)	0,01	0,05	0,04	0,09	0,39	0,26
Ác. Linolêico (C18:2n6c)	2,82	0,45	16,11	16,08	2,79	10,34
Ác. Gama Linolênico (C18:3n6)	0,26	0,02	0,53	0,51	0,06	0,36
Ác. Linolênico (C18:3n3)	0,18	0,10	1,31	1,27	0,70	1,06
Ác. Cis-Eicosadienóico (C20:2)	0,13	0,03	0,63	0,63	0,16	0,46
Ác. Cis-Eicosatrienóico (C20:3n3)	0,03	0,02	0,21	0,20	0,09	0,17
Ác. Cis-Eicosatrienóico (C20:3n6)	0,19	0,02	0,52	0,49	0,14	0,37
Ác. Araquidônico (C20:4n6)	0,26	0,22	0,79	0,75	1,71	1,23
Ác. Docosadienóico (C22:2n6)	0,01	n.d.	0,06	0,04	0,04	0,02
Ác. Cis-Eicosapentaenóico (C20:5n3)	0,01	0,77	0,34	0,24	4,79	2,19
Ác. Cis-Docosahexaenóico (C22:6n3)	0,11	2,30	3,03	2,89	17,11	8,84
Ác. Elaidico (C18:1n9t)	0,13	0,03	0,03	0,26	0,15	0,24
Extrato Etéreo	24,87	14,25	94,83	94,56	90,75	93,83

RT: Resíduo bruto de tilápia; RB: Resíduo bruto de beijupirá; STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹.

*n.d.= não detectado.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3).

Os ácidos graxos presentes nos resíduos e nas frações lipídicas da silagem tanto de tilápia, quanto de beijupirá são, predominantemente, os insaturados, sendo que o ácido oleico (18:1) apresentou-se em maior quantidade na fração analisada (Tabela 5.7). Este resultado corrobora com os observados por Backhoff (1976), Green (1988), Maia et al. (1998) e Sales (1995), que observaram maior quantidade deste ácido graxo em silagens de tilápia. Os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico e o ácido esteárico se apresentaram em teores mais elevados. Estes resultados estão em conformidade com os apresentados por Maia et al. (1998), Valério (1994) e Ferraz de Arruda (2004) que observaram valores maiores para estes mesmos ácidos graxos.

Nesta pesquisa foram encontrados valores EPA na faixa de 0,01 a 4,79 em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e de DHA na faixa de 0,11 a 17,1 em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Maia et al. (1998) obtiveram valores de 2,3 e 9,7 de EPA e DHA. 100g^{-1} de óleo, respectivamente, na silagem ácida de resíduo de tilápia, corroborando com os resultados encontrados neste experimento. O mesmo foi observado por Espínola-Filho (1999) que encontrou valores de 1,1 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de óleo para o EPA e 1,1 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de óleo para o DHA, estudando a silagem ácida produzida a partir de diferentes matérias-primas, com 60 dias de armazenamento. Ferraz de Arruda (2004) observou para o óleo de silagem de tilápia extraído pelo método de centrifugação, apenas traços de EPA e DHA. Santana-Delgado, Avila e Stelo (2008), pesquisaram silagem elaborada a partir de cavala espanhola (*Scomberomorus maculatus*) e observaram valores de 6,5 e 10,9 de EPA e DHA. 100g^{-1} de óleo, respectivamente, valores próximos aos encontrados nas silagens de beijupirá.

A presença de ácidos graxos altamente insaturados na fração lipídica da silagem de pescado e de seus produtos favorecem a oxidação e as reações de degradação (OLCOTT, 1962).

5.2.10.8 Caracterização do sedimento das silagens

A silagem é produto da autólise de peixes e subprodutos; em pH ácido, as enzimas presentes nos peixes degradam e liquefazem os tecidos, enquanto a deterioração bacteriana é minimizada. A principal ação é proteolítica, no entanto essa reação não prossegue por completo devido a presença de resíduo resistente (BACKHOFF, 1976; GILDBERG; RAA, 1977; HALL et al., 1985; JOHNSEN; SKREDE, 1981; RAA; GILDBERG, 1976; TATTERSON; WINDSOR, 1974). A proteína não digerida é geralmente encontrada como um sedimento insolúvel ou lama no fundo da silagem (RAGHUNATH; MCCURDY, 1987).

A Tabela 5.8 apresenta os teores de aminoácidos dos sedimentos das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, obtidos por centrifugação.

Tabela 5.8 – Aminoácidos presentes nos sedimentos obtidos das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, em g 100g⁻¹

Aminoácidos	Sedimentos			
	STT1	STT2	SBT1	SBT2
Alanina	1,27	1,19	1,00	1,28
Arginina	1,14	1,15	0,95	1,27
Ác. Aspártico	1,59	1,74	1,34	1,50
Glicina	1,80	1,42	1,37	1,92
Isoleucina	0,78	0,87	0,58	0,67
Leucina	1,36	1,50	0,94	1,05
Ác. Glutâmico	2,51	2,75	2,01	2,30
Lisina	1,45	1,61	1,05	1,20
Cistina	0,21	0,24	0,26	0,21
Metionina	0,54	0,58	0,37	0,21
Fenilalanina	0,81	0,88	0,61	0,69
Tirosina	0,60	0,69	0,46	0,52
Treonina	0,78	0,85	0,58	0,65
Aminoácidos	Sedimentos			
	STT1	STT2	SBT1	SBT2
Triptofano	n.d.*	n.d.	n.d.	n.d.
Prolina	1,14	0,93	0,86	1,16
Valina	0,94	1,00	0,75	0,84
Histidina	0,42	0,43	0,27	0,31
Serina	0,81	0,85	0,65	0,74
Taurina	0,18	0,18	0,11	0,09
Proteína Bruta	18,97	19,34	16,56	18,64

STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹;
 STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹;
 SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹;
 SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹.

*n.d.= não detectado.

Valores representam as médias, sendo n=3.

A composição de aminoácidos nos sedimentos das diferentes silagens elaboradas apresentou-se de forma homogênea. Os maiores valores foram observados para o ácido glutâmico, o ácido aspártico, a lisina e a alanina. Os valores mais elevados dentre os aminoácidos essenciais ocorreram para alanina e lisina, na faixa de 1,00 a 1,28 e 1,05 a 1,61, respectivamente, corroborando com os resultados encontrados por Morales-Ulloa e Oetterer (1997) em ensilados de sardinha (*Sardinella brasiliensis*). O triptofano não foi detectado, corroborando com Jackson, Kerr e Cower (1984) onde o teor de triptofano foi menor em relação aos outros aminoácidos, pois este aminoácido tende a se decompor nas silagens ácidas (BACKOFF, 1976; RAA; RAA, GILDBERG, 1982; STROM; EGGUM, 1981).

A Tabela 5.9 apresenta a composição em minerais dos sedimentos das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, obtidos por centrifugação.

Tabela 5.9 – Composição média dos macros (g 100g⁻¹) e microelementos (mg kg⁻¹) minerais dos sedimentos das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, obtidos por centrifugação

Mineral	Sedimento			
	STT1	STT2	SBT1	SBT2
Macro				
K	0,37	0,41	0,33	0,19
Ca	4,75	6,27	8,37	5,63
Mg	0,09	0,07	0,10	0,08
P	4,15	7,53	8,59	5,24
Micro				
Na	2302	2475	3201	2174
Zn	74	102	69	61
Fe	194	203	177	241
Mn	7	11	9	10
Cu	10	3	3	3

STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹;
 STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹;
 SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹;
 SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹.

Valores representam as médias ± desvio padrão (n=3).

O conteúdo de minerais para os sedimentos das silagens elaboradas apresentaram-se similares entre as espécies e entre os tratamentos testados. Os teores de cálcio e fósforo foram na faixa de 4,75 a 8,37 e 4,15 a 8,59 g.100g⁻¹, respectivamente. Os teores de cálcio e fósforo no processo de silagem se devem à porção óssea do pescado. Stone e Hardy (1986) avaliaram o teor de cálcio de algumas espécies de peixes e concluíram que este componente apresenta-se variável entre as espécies. Kompiang et al. (1980), confirmaram a importância das escamas como fonte de cálcio estudando sardinha e obtiveram valores de 4,6% deste elemento em amostras de peixe inteiro, corroborando com o presente estudo. Para o teor de fósforo, Sales (1995) encontrou o teor de 1,0 % em silagem elaborada a partir de tilápia do Nilo (peixe inteiro com vísceras e escamas), valor este, abaixo do encontrado nesta pesquisa.

Existe pouca literatura disponível sobre os teores de outros minerais na silagem. A maior presença de minerais ocorre no peixe integral ou nas sobras (cabeça, cauda e vísceras) devido às altas concentrações desses minerais nos ossos (KOMPIANG et al., 1980; MEDINA et al., 1956; SALES, 1995). A biodisponibilidade dos minerais é maior em fontes animais (SATHE; DESHPANDER; SALUNKHE, 1984). Fatores que afetam a utilização biológica destes nutrientes incluem a digestibilidade do alimento que contém o mineral, as formas químicas nas quais eles se apresentam, os níveis dietéticos de outros nutrientes, a presença de quelatos para os animais, o tamanho da partícula do alimento e as condições de processamento do mesmo (SALES, 1995).

Os resultados sugerem que as frações insolúveis recuperadas das silagens tanto de tilápia quanto de beijupirá, elaboradas nos diferentes tratamentos, apresentam nutrientes e podem ser consideradas como um ingrediente em dietas equilibradas para alimentação animal.

5.3 Conclusões

Os processos para obtenção das silagens de tilápia e beijupirá são de baixa complexidade, mostrando-se uma alternativa para se aproveitar os resíduos. Estes coprodutos apresentaram-se pastosos e homogêneos a partir de 48h da elaboração, sob temperatura ambiente (25±1°C).

O pH se manteve próximo de 4, revelando que os tratamentos garantiram a qualidade do coproduto em temperatura ambiente (25±1°C), por um tempo de armazenamento de 40 dias.

Os resultados da composição centesimal demonstraram teores elevados de cinza para todas as amostras. Os teores de proteínas nas silagens e no resíduo apresentaram-se como sendo fontes de aminoácidos livres e peptídeos.

Observou-se que os tratamentos que não foram adicionados BHT tiveram valores de Índice de peróxido elevados, indicando que houve um processo de degradação da fração lipídica presente nas silagens, fato que reafirma a utilização de um antioxidante, como o BHT nas formulações. Houve também um aumento gradual no Nitrogênio não proteico durante a hidrólise, ascendendo de forma significativa entre os tempos de armazenamento.

As silagens demonstraram melhores rendimentos das frações aquosas no período de 10 e 20 dias de estocagem.

Para a composição de ácidos graxos, tanto para os resíduos, quanto para as silagens observou-se que o ácido oleico (18:1) apresentou-se em maior quantidade nas frações analisadas.

As silagens de tilápia e beijupirá mostraram-se uma alternativa na produção de coprodutos devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados e aminoácidos, tendo grande potencial como suplemento alimentar.

Este estudo dispõe o procedimento operacional de forma padronizada para elaboração do novo produto (Anexo B).

Referências

ANBE, L. **Prospecção de componentes bioativos em resíduos do processamento do pescado visando à sustentabilidade da cadeia produtiva**. 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 14. ed. Washington, DC, 1995. 1141 p.

AMERICAM OIL CHEMIST'S SOCIETY - AOCS. **Official methods and recommended practices of the Americam Oil Chemist's Society**. 5. ed. Champaign, IL, 1998. 1430 p.

AMERICAM OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**. 5 ed. Champaign, 2003.

BACKOFF, H.P. Some chemical changes in fish silage. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 11, p. 353-363, 1976.

BATISTA, I.; RAMOS, C.; MENDONÇA, R.; NUNES, M.L. Enzymatic hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) by-products and lipid recovery. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, London, v. 18, n. 1, p. 120-134, 2009.

BERAQUET, N.J.; GALACHO, S.A.A. Composição, estabilidade e alterações na fração protéica e no óleo de ensilados de resíduos de peixe e de camarão. **Coleção Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 13, p. 149-174, 1983.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 145 p.

BORGHESI, R. **Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BORGHESI, R.; FERRAZ DE ARRUDA, L. F.; OETTERER, M. A silagem de pescado na alimentação de organismos aquáticos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 329-339, 2007.

BORGHESI, R.; PORTZ, L.; OETTERER, M.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 242-248, 2008.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Lei nº 9605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 fev. 1998.

CONNELL, J.L.; HOWGATE, P.F. The amino acid composition of some British food fishes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 10, p. 241-248, 1959.

DISNEY, J.G.; HOFFMAN, A. Development of a fish silage/carbohydrate animal feed for use in the tropics. **Tropical Science**, London, v. 20, p. 129-135, 1978.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J.P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2327-2332, 2006.

EINSET, E.; OLCOTT, H.; STANSBY, M.E. Oxidative deterioration in fish and fishery products. IV. Progress in studies concerning oxidation of extracted oils. **Communication in Fisheries Review**, Silver Spring, MD, v. 19, n. 5, p. 35-42, 1957.

ESPE, M.; RAA, J.; NJAA, L.R. Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 49, p. 259-270, 1989.

ESPÍNOLA-FILHO, A. **Aproveitamento do resíduo sólido de peixe, camarão e bivalves como ingredientes de ração para aquicultura**. 1999. 224 f. Tese (Doutorado em Saneamento Básico) – Universidade Mackenzie, São Paulo, 1999.

FAO. **Energy and protein requirements**. Report of joint FAO/WHO/ONU Expert Consultation Technical Report. Roma, 1985. (FAO Series, 724).

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2014. 244 p.

FAGBENRO, O.A.; JAUNCEY, K. Chemical and nutritional quality of raw, cooked and salted fish silage. **Food Chemistry**, Barking, v. 48, p. 331-335, 1993.

FAID, M.; ZOUTEN, A.; ELMARRAKCHI, A.; ACHKARI-BEGDOURI, A. Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient. **Food Chemistry**, Barking, v. 60, n. 1, p. 13-18, 1997.

FELTES, M.M.C.; CORREIA, J.F.G.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; NINOW, J.L.; SPILLER, V.R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.

FERRAZ DE ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FERRAZ-ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; BRUM, A. S.; D'ARCE, M; OETTERER, M. Ácidos graxos em silagem de resíduos do processamento da tilápia do Nilo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: CBNA-AMENA, 2006. 1 CD-ROM.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; OETTERER, M. Fish silage - a review. **Brazilian Archives Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, p. 879-886, 2007.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; PORTZ, L.; CYRINO, J. E. P.; OETTERER, M. Fish silage in black bass (*Micropterus salmoides*) feed as an alternative to fish meal. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 5, p. 879-886, 2009

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 22, p. 497-509, 1957.

FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

GILDBERG, A.; RAA, J. Properties of propionic acid/formic acid preserved silage of cod viscera. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 28, n. 3, p. 647-653, 1977.

GRAY, J.I.; PEARSON, A.M. **Rancidity and warmed-over-flavor**. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. (Ed.). **Advances in meat research: restructured meat and poultry products**. New York: AVI, 1987. v. 3.

GREEN, S. **The use of fish silage in pig nutrition**. 1984. 230 p. Thesis (Ph.D.) - University of Nottingham, Nottingham, 1984.

GREEN, S.; WISEMAN, J.; COLE, D.J.A. Examination of stability, and its effect on nutritive value, of fish silage in diets for growing pigs. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 21, p. 43-56, 1988.

HALL, G.M.; KEEBLE, D.; LEDWARD, D.A.; LAWRIE, R.A. Silage from tropical fish 1. Proteolysis. **Journal of Food Technology**, Faisalabad, v. 20, p. 561-572, 1985.

HARDY, R.W.; MASUMOTO, T. Specifications for marine by-products for aquaculture. In: In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON FISH BY-PRODUCTS, 1991, Singapura. **Making profits out of seafood wastes; proceedings...** Singapura: ASA, 1991. p.99-108.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, p. 475-477, 1973.

JACKSON, A.J.; KERR, A.K.; COWER, C.B. Fish silage as a dietary ingredient for salmon. I. Nutritional and Storage characteristics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 38, p. 211-220, 1984.

JOHNSEN, F.; SKREDE, A. Evaluation of fish viscera silage as a feed resource. **Acta Agriculturae Scandinavica**, London, v. 31, p. 21-28, 1981.

JONES, N.R. The free amino acid of fish. II. Fresh skeletal muscle from lemon sole (*Pleuronectes microcephalus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 10, p. 282-288, 1959.

LOVERN, J.A. The lipids of fish and changes occurring in them during processing and storage. In: HEEN, E.; KREUZER, R. (Ed.). **Fish in nutrition**. London: Fishing News Ltd, 1962.

KOMPIANG, I.P. Fish silage: its prospect and future in Indonesia. **Indonesia Agricultura Research & Development Journal**, Jakarta, v. 3, p. 9-12, 1981.

LANTZ, A.W. Special products from freshwater fish. **Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada**, Ottawa, v. 151, p. 45-48, 1966.

LO, K.V.; LIAO, P.H.; GAO, Y. Effects of temperature on silage production from salmon farm mortalities. **Bioresource Technology**, Essex, v. 44, n. 1, p. 33-37, 1993.

MAI, J.; SHETTY, J.K.; KAN, T.M.; KINSELLA, J.E. Protein and amino acid composition of select freshwater fish. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 28, p. 884-885, 1980.

MAIA, W.M.; NUNES, M.L.; FIGUEIREDO, M.J.; BRAGAGNOLO, N. Caracterização da fração lipídica de silagem de resíduo de tilápia para utilização em rações para a aquicultura. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 10., 1998, Recife. **Anais...** Recife: Persona, 1998. v. 2, p. 55-64.

MEDINA, S.; BLANCO, M.; NIND, A.; LARRU, F.; LOBILLO, E. Determination espectrofotométrica de hierro, manganês, cobre, molibdeno, cobalto y fosforo total em la hueva de la merluza (*Merluccius merluccius* L.). **Anales Bromatologia**, Madrid, v. 8, n. 2, p. 313-315, 1956.

MOHR, V. Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis. In: **BIOCHEMICAL ASPECTS OF NEW PROTEIN FOOD**, 11., 1977, Copenhagen. **Proceedings...** Oxford: Federation of European Biochemical Societies, 1977. v. 44, p. 53-62.

MOORE, I.; STEIN, W.H. Chromatographic determination of amino acids by use of automatic recording equipment's. **Methods in Enzymology**, New York, v. 6, p. 919-931, 1963.

MORALES-ULLOA, D.F.; OETTERER, M. Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 206-214, 1995.

MORALES-ULLOA, D.F.; OETTERER, M. Composição em aminoácidos de silagens químicas, biológicas e enzimáticas preparadas com resíduos de sardinha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 252-258, 1997.

OLCOTT, H.S. Marine products. In: SCHULTZ, H.W. (Ed.). **Symposium of foods: lipids and their oxidation**. Westport: AVI, 1962. p. 354-359

PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N. P. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 553 p.

RAGHUNATH, M.R.; MCCURDY, A.R. Autolysis-Resistant Sediment in Fish Silage. **Biological Wastes**, Barking, v. 20, p. 227-239, 1987.

RAA, J.; GILDBERG, A. Fish silage: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 16, n. 4, p. 383-419, 1982.

SALES, R. O. **Processamento, caracterização química e avaliação nutricional da silagem da despesca da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em dietas experimentais com ratos**. 1995. 174 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

SANTANA-DELGADO, H.; AVILA, E.; STELO, A. Preparation of silage from Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*) and its evaluation in broiler diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. 129-140, 2008.

SATHE, S.K.; DESHPANDER, S.S.; SALUNKHE, D.K. Dry beans of Phaseolus. Part2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipid. **CRC Critical Review Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 21, p. 41-93, 1984.

SEIBEL, N.F.; SOUZA-SOARES, L.A. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 333-337, 2003.

SHARDA, D.P.; MAHAN, D.C.; WILSON, R.F. Limiting amino acid in low protein corn soybean meal diets for growing-finishing swine. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 42, n. 5, p. 1175-1181, 1976.

SMITH, K.J. Soybean meal: production, composition and utilization. **Feedstuffs**, Minneapolis, v. 49, p. 22-25, 1977.

SPIES, J.R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 39, p. 1412-1415, 1967.

STEVANATO, F.B., SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M., VISENTAINER, J.V. Aproveitamento de resíduos, valor nutricional e avaliação da degradação de pescado. **PUBVET**, Londrina, v. 1, n. 7, ed. 6, art. 171, 2007. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigos_imp.asp?artigo=171>. Acesso em: 21 mar. 2014.

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

STROM, T.; EGGUM, B.O. Nutritional value of fish viscera silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 32, n. 2, p. 115-20, 1981.

SUCASAS, L.F.A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de coprodutos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva**. 2011. 164 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TATTERSON, J.N.; WINDSOR, M.L. Fish silage. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, v. 25, n. 1, p. 369-379, 1974.

VALÉRIO, A.C.R. **Elaboração de silagem enzimática de pescado como alternativa ao processo tradicional**. 1994. 102 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

VIDOTTI, R.M.; VIEGAS, E.M.M.; CARNEIRO, D.J. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 199-204, 2003.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. **Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal**. São Paulo: Instituto de Pesca, 2006.

WEE, K.L.; KERDCHUEN, N.; EDWARDS, P. Use of waste grown tilapia silage as feed for *Clairias batrachus* L. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, Calcutta, v. 1, p. 127-137, 1986.

WIGNAL, J.; TATTERSON, I.N. Fish silage. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 11, p. 17-22, 1976.

6 ELABORAÇÃO DE COPRODUTO PEPTONA OBTIDO VIA FRACIONAMENTO DAS SILAGENS DE DUAS ESPÉCIES DE PESCADO.

Resumo

Este estudo visou elaborar e verificar a viabilidade de produção do coproduto peptona, obtido a partir da fração aquosa de silagem. Resíduos do processamento de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e beijupirá (*Rachycentron canadum*) foram triturados, separadamente, obtendo-se uma massa homogênea à qual foram adicionados ácidos em dois diferentes tratamentos, a saber, ácido cítrico: ácido fórmico; 1:3; 3% v/massa; ácido propiônico: ácido fórmico; 1:3; 3%v/massa. As silagens foram armazenadas a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 40 dias. Foi realizado o fracionamento das silagens e a liofilização das frações aquosas obtidas. As amostras liofilizadas foram submetidas à análise química para caracterização e avaliação da efetividade do liofilizado como peptona. A fração aquosa das silagens tanto de tilápia, quanto de beijupirá, apresentou teores elevados de ácido glutâmico, lisina, glicina e ácido aspártico. Estes aminoácidos apresentaram-se em menores teores do que os presentes na peptona comercial. Porém, estas frações mostraram-se efetivas no crescimento dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, tanto pela detecção por densidade ótica, como pelos métodos de plaqueamento e produção de biomassa, sendo equivalente à peptona comercial. Os resultados obtidos indicam que é possível agregar valor ao material residual gerado nas unidades processadoras de pescado, ao elaborar o coproduto peptona. Este estudo dispõe os procedimentos operacionais de forma padronizada para elaboração do produto.

Palavras-chave: sustentabilidade; resíduo de pescado; silagem; coproduto; tilápia; beijupirá; peptona.

Peptone as a byproduct obtained via fractionation of silages from two fish species.

Abstract

This study aimed to prepare and verify the feasibility of peptone production as a byproduct obtained from the silage aqueous fraction. Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and beijupirá (*Rachycentron canadum*) processing wastes were ground separately to obtain a homogeneous mass in which was added in two different acid treatments: (1) citric acid and formic acid, 1:3; 3% v / m; (2) propionic acid: formic acid, 1:3, 3% v/ m. Silages were stored ($25\pm 1^\circ\text{C}$) for 40 days. Silage was fractionated and the aqueous fractions lyophilized. The lyophilized samples were submitted to chemical analysis aiming to characterize and evaluate the effectiveness of the lyophilized as peptone. Both tilapia and beijupirá silage aqueous fraction showed high levels of glutamic and aspartic acids, lysine, and glycine. These amino acids were found in lower concentrations than those of commercial peptones. However, the fractions obtained were effective in promoting the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* microorganisms, as showed by both optical density and by biomass production and culture media methods, being equivalent to the commercial peptone. The results obtained indicate that it is possible to add value to the waste generated in the fish processing units, when a peptone byproduct is produced. This study provides standardized operational procedures to prepare this product.

Keywords: sustainability; fish residue; silage; byproduct; tilapia; beijupirá; peptone.

6.1 Introdução

As peptonas são definidas como hidrolisados de proteínas que são facilmente solúveis em água e não são precipitáveis por calor, por álcalis ou por saturação com sulfato de amônio (VASILEVA-TONKOVA; NUSTOROVA; GUSHTEROVA, 2007). Peptonas para fins microbiológicos são obtidos a partir de carne bovina, suína e equina, porém diversos estudos relatam que o tecido muscular e o resíduo de pescado podem ser matéria-prima para elaboração de peptona de qualidade similar (JAYATHILAKAN et al., 2012).

Os elevados níveis de enzimas digestivas presentes nas vísceras permitem que a digestão das proteínas de pescado seja economicamente mais viável a partir da utilização dos resíduos marinhos como fonte de nutrientes. Durante o processo de estocagem da silagem, ocorre autólise, em condições ácidas, onde as proteínas das vísceras são decompostas em produtos solúveis de baixo peso molecular, constituindo uma mistura complexa de peptídeos e aminoácidos, e que podem ser usados como fonte de nitrogênio em meios de cultura microbiana (POERNOMO; BUCKLE, 2002). O nitrogênio é o componente mais oneroso dos substratos para crescimento microbiano, sendo as peptonas as principais fontes deste nutriente (TASKIN, KURBANOGLU, 2011).

Devido aos elevados teores de proteínas, as espécies de pescado de baixo custo e os subprodutos representam uma fonte potencial de peptonas industriais. Peptonas de pescado têm sido apresentadas em catálogos da mídia nas últimas décadas, particularmente, os hidrolisados de proteínas de algumas espécies de peixes, que têm sido relatados como substratos de crescimento microbiano (DUFOSSÉ et al., 2001; SOUISSI et al., 2009).

A utilização de material proveniente de peixes como fonte de nutrientes para os micro-organismos foi relatada desde a década de 1940, por Tarr e Deas (1949). Desde então, algumas tentativas para explorar a utilização de peptonas de pescado como meio de cultura microbiano foram estudadas (DUFOSSÉ et al., 2001; GILDBERG et al., 1989). Os resíduos de peixes têm sido investigados como matéria-prima de peptona para crescimento microbiano (STROM; RAA, 1993). Igualmente, a utilização de resíduos de camarão como fonte de nitrogênio foi relatada em outros estudos (RAO; DWARAKANATH; SARASWATHI, 1980; SOPHANODORA; BUCKLE, 1988). Algumas pesquisas, demonstraram que as bactérias crescem bem em peptonas provenientes de tecidos de diferentes espécies de peixes. A peptona de vísceras de pescado demonstrou bom desempenho como fonte de nitrogênio para meio de crescimento microbiano, ao ser utilizado no cultivo de patógenos como *Vibrio salmonicida* para produção de vacinas (VECHT-LIFSHITZ; ALMAS; ZOMER, 1990). Vieira et al. (2005)

constatarem a efetividade de peptonas obtidas a partir de hidrólise enzimática de carne e de resíduo do processamento de lagostas (*Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*), camarão (*Macrobrachium amazonicum*) e pescada (*Plagioscion squamosissimus*) para utilização em meios de cultura no crescimento de *Escherichia coli*. Vázquez, González e Murado (2004a) analisaram peptonas elaboradas com diferentes resíduos de pescado (albacora (*Thunnus albacares*), lula (*Loligo vulgaris*), peixe-espada (*Xiphias gladius*) e truta arco-íris (*Oncirhynchus mykiss*) e observaram que todas as peptonas foram mais eficientes que a peptona comercial.

Souissi et al. (2009) testaram hidrolisados proteicos de sardinhas (*Sardinella aurita*) como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento de *Staphylococcus simulans* e observaram que a peptona elaborada constitui-se em bom substrato para o crescimento do micro-organismos. Deraz et al. (2011) utilizaram enzimas endógenas das vísceras de tilápia (*Tilapia nilótica*) para elaboração de peptona em diferentes pHs e observaram que estas peptonas deram suporte para o crescimento de bactérias lácticas, recomendando o uso destes material no crescimento microbiano. O mesmo foi observado por Safari et al. (2012), que estudaram hidrolisados enzimáticos de resíduos de cabeças de albacora (*Thunnus albacares*), demonstrando a efetividade deste no crescimento de bactérias ácido-lácticas.

Peptonas de pescado podem promover um melhor crescimento que as peptonas comerciais de alta qualidade. A razão para isto não é conhecida e não é facilmente explicada por diferenças distintas na composição de aminoácidos, porém uma possível explicação poderia estar no fato de que os tecidos de pescado geralmente são mais ricos em compostos nitrogenados solúveis do que a maioria dos outros tecidos biológicos (GILDBERG et al., 2010).

O fracionamento por centrifugação para obtenção da fração aquosa proporciona a utilização do trinômio rotação-tempo-temperatura, produzindo um coproduto que mantém a qualidade nutricional (ANBE, 2011). Por meio da centrifugação das silagens, ocorre a separação em 3 fases distintas: fase lipídica, aquosa e sedimentada, conforme já afirmado por Reece (1980) e Ferraz de Arruda (2004). Entretanto, há poucas pesquisas a respeito do fracionamento da silagem e da separação das fases distintas para encaminhamento e elaboração de coprodutos, por isso o interesse em pesquisar este processo para obtenção de coprodutos de qualidade.

Os objetivos desta pesquisa foram elaborar a silagem dos resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), a silagem de resíduos de beijupirá (*Rachycentron canadum*) e

fracioná-las de forma a obter a fração aquosa; analisar a composição em proteínas e aminoácidos desta fração e verificar a efetividade desta fração como peptona para a estabilização e crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

6.2 Desenvolvimento

6.2.1 Matéria-prima

A matéria-prima para elaboração da silagem foi proveniente das espécies tilápia (*Oreochromis niloticus*) e de beijupirá (*Rachycentron canadum*). Os resíduos de tilápia foram fornecidos de uma empresa processadora de tilápia da cidade de Curitiba, PR; e os resíduos de beijupirá de uma empresa de cultivo de Ubatuba, SP.

O resíduo obtido foi constituído de aparas de tecido muscular, cabeças, nadadeiras, carcaças e vísceras, material de descarte do processamento. Cada lote de resíduo foi triturado separadamente, para a formação de uma massa homogênea, em triturador, cujas especificações do fabricante são: Picador de carne 98 BT parcial inox, motor de 3 CV. Foi adicionado a este material, o antioxidante BHT (hidroxibutilanisol), dissolvido em álcool etílico, na concentração de 0,02g 100g⁻¹ (BRASIL, 1998).

6.2.2 Elaboração da silagem química

Com as matérias-primas, previamente trituradas, e divididas em lotes foram elaborados diferentes tratamentos com formulações de ácidos descritas na Tabela 6.1. As soluções foram adicionadas manualmente ao resíduo homogeneizado, sob constante revolvimento, obtendo-se as silagens de tilápia e de beijupirá; em seguida foi feito o controle do pH para que este permanecesse próximo de 4. As silagens foram mantidas a temperatura ambiente (25±1°C), até a estabilização do pH.

Tabela 6.1 - Tratamentos para elaboração da silagem de tilápia e de beijupirá

Tratamento	Descrição
STT1	Silagem de tilápia com adição de Ácido cítrico + Ácido Fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .
STT2	Silagem de tilápia com adição de Ácido propiônico + Ácido fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .
SBT1	Silagem de beijupirá com adição de Ácido cítrico + Ácido Fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .
SBT2	Silagem de beijupirá com adição de Ácido propiônico + Ácido fórmico na proporção de 1:3, na relação de 3% do volume da solução ácida para a massa de resíduo + BHT 0,02g 100g ⁻¹ .

6.2.3 Fracionamento da silagem química e liofilização da fração aquosa

As silagens foram fracionadas de acordo com o método descrito por Dumay et al., (2006). As amostras foram submetidas à centrifugação, em centrífuga, cujas especificações do fabricante são: Centrífuga refrigerada 5810 R Eppendorf, a 8.500 RPM, por 30 minutos, a 0°C. Três fases foram obtidas (sedimento, fase aquosa e fase lipídica), sendo a fração aquosa conduzida à liofilização. As demais frações foram armazenadas a -18°C, para posteriores análises.

As frações aquosas obtidas foram liofilizadas em liofilizador Modelo Liotop 101. A operação constituiu na utilização de, aproximadamente, 100 ml de cada fração aquosa por um tempo de 48 horas. O rendimento do liofilizado foi calculado individualmente, pesando o material antes da liofilização e, posteriormente, a massa seca. Os cálculos foram feitos em relação à fração aquosa obtida e expressos em porcentagem.

Em seguida, o material foi armazenado em frascos de vidro com tampa de rosca, vedados, para evitar contato com a umidade e armazenados sob refrigeração (4 e 8°C) para posterior utilização nos testes de efetividade ou de avaliação do produto como peptona.

6.2.4 Caracterização dos aminoácidos das frações aquosas

6.2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises de aminoácidos foram feitas por cromatografia líquida, em colunas de troca catiônica e derivação pós-coluna com ninhidrina, em auto analisador. Para qualificação de aminoácidos, as amostras foram hidrolisadas com HCl 6N com 3% de fenol, por 24 horas, a 110°C (MOORE; STEIN, 1963). O triptofano foi determinado após hidrólise enzimática com Pronase a 40°C por 24 horas, seguido de reação calorimétrica com 4-dimetil-amino-benzaldeído (DAB) em ácido sulfúrico 21,2N e leitura a 590 nm (SPIES, 1967). O teor de triptofano foi calculado a partir da curva padrão, segundo Spies (1967).

6.2.5 Testes de efetividade das peptonas

6.2.5.1 Fonte de microrganismos

Os micro-organismos utilizados nos testes de efetividade das peptonas foram provenientes de cepas puras de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Estes foram inicialmente reativados, a partir das culturas estoque, mantidos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 18 a 24 h, a 37°C e, posteriormente, cultivados em BHI ágar por mais 24 h, a 37°C.

6.2.5.2 Preparação das peptonas

Antes do preparo das peptonas, foram realizados testes de esterilidade das peptonas pelo método de contagem padrão em placas e mesófilos por plaqueamento em meio Plate Count Agar e o material foi incubado em estufa, a 37°C por 24 horas (SILVA, 2010).

Os meios de cultura líquidos para as cepas puras foram preparados de acordo com Poernomo e Buckle (2002), com dextrose a 0,1% (v/v) e peptonas testes a 0,5% (m/v), em água destilada, sendo a peptona comercial da marca Difco testada para comparação. O pH foi ajustado para 7, usando HCl, 1M ou NaOH, 1M. Os meios de cultura foram autoclavados a 121°C por 15 minutos.

6.2.5.3 Detecção do crescimento microbiano por Densidade Ótica – cepas puras

Após a reativação dos micro-organismos, as colônias individuais foram removidas com o auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. O volume de 100 µL das suspensões previamente padronizadas em $1-2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ por turbidimetria, a 600 nm, foram inoculadas em 100 mL das peptonas teste, previamente preparadas. O material foi incubado em estufa, a 37°C. O crescimento microbiano foi monitorado pela leitura da Densidade Ótica (DO) das peptonas, a 600 nm, periodicamente, até 36h, para a construção de curvas de crescimento. Foram desenvolvidos também, em conjunto, testes sem inoculação microbiana, como controle.

6.2.5.4 Detecção por Plaqueamento

Para o teste de detecção por plaqueamento, os micro-organismos inicialmente reativados, foram removidos com o auxílio de uma alça de platina e suspensos em uma solução de NaCl 0,89% estéril. O volume de 100 µL das suspensões previamente padronizadas em $1-2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ por turbidimetria, a 600 nm, foram inoculadas em 100 mL das peptonas teste, previamente preparadas. O material foi incubado em estufa, a 37°C por 36h. A partir desta, foram feitas mais cinco diluições decimais em tubos, a partir de 1 mL e diluindo-se em 9 mL de peptonas testes estéreis. Alíquotas de 1 mL das diluições de 10^{-1} a 10^{-5} foram inoculadas, em duplicata, em placas de Petri e, em seguida, foi adicionado o meio de cultura sólido (ágar comercial). Após a homogeneização e completa solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas invertidas em estufa a 35°C por 48h, para a contagem padrão. O ágar foi composto de dextrose + peptona comercial + ágar.

6.2.5.5 Produção de biomassa

O teste de produção de biomassa ocorreu de acordo com Poernomo e Buckle (2002), onde 25 mL de cultura incubada por 24 horas foram transferidas para tubos falcon estéreis e centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em solução salina 0,85% e centrifugado novamente (10.000 x g 15 minutos⁻¹). O precipitado foi transferido para placas de petri para pesagem inicial e incubados a 105°C por 24 h para secagem e pesados novamente. Os valores foram expressos em g biomassa 100mL⁻¹.

6.2.6 Avaliação estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio do *Software Statistica Version 12*. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a fim de observar as diferenças significativas entre os valores médios ($p \leq 0,05$).

6.2.7 Resultados e Discussão

6.2.7.1 Frações aquosas liofilizadas (Peptonas)

Para aplicação nos testes como peptona, as frações aquosas foram liofilizadas e podem ser observadas na Figura 6.1.

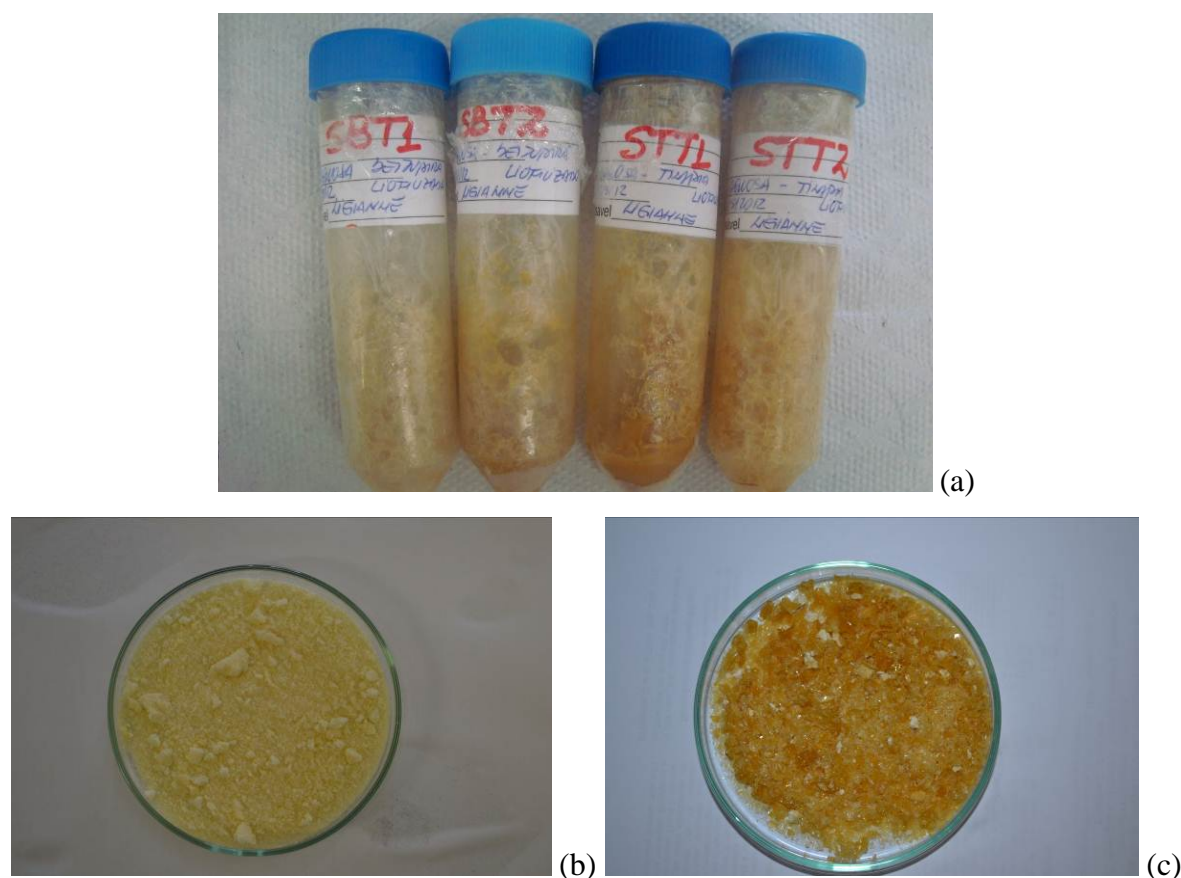


Figura 6.1 - Frações aquosas das silagens de tilápia e de beijupirá liofilizadas em tubos Falcon (a); Peptona de beijupirá (SBT1) (b); Peptona de tilápia (STT1) (c).

STT1: Silagem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$;
 STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$;
 SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$;
 SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$.

O rendimento dos liofilizados foi de, aproximadamente, 4,2 e 5,29% para as frações aquosas STT1 e STT2, respectivamente. Para as frações aquosas de beijupirá, os valores encontrados foram menores, apresentando-se 3,04 e 3,39% para SBT1 e SBT2, respectivamente. As peptonas, na sua forma pura, apresentam textura de pó e cor amarelada, corroborando com as observações de Vasileva-Tonkova, Nustorova e Gushterova (2007); para estes autores além dos aspectos citados, as peptonas são facilmente solúveis em água e não são precipitáveis pelo calor, álcalis ou saturação com sulfato de amônio.

No teste de esterilidade, as peptonas liofilizadas não apresentaram contagem de micro-organismos ($< 10^{-1}$ UFC g^{-1}), indicando que o produto estava sem contaminantes, podendo ser submetido aos testes de efetividade.

6.2.7.2 Caracterização dos aminoácidos das frações aquosas

A composição de proteína bruta e a composição em aminoácidos das frações aquosas das silagens de tilápia e beijupirá estão demonstradas na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Aminoácidos presentes nas frações aquosas obtidas das silagens de tilápia e beijupirá, nos diferentes tratamentos, em $g\ 100g^{-1}$

Aminoácidos	Fração aquosa				
	STT1	STT2	SBT1	SBT2	Difco*
Alanina	0,74	0,71	0,77	0,62	7,7
Arginina	0,60	0,66	0,73	0,59	8,6
Ácido Aspártico	0,83	0,74	0,96	0,59	7,7
Glicina	0,72	0,75	1,00	0,84	16,4
Isoleucina	0,53	0,46	0,45	0,33	1,8
Leucina	0,92	0,82	0,76	0,58	4,4
Ácido Glutâmico	1,50	1,36	1,56	1,15	12,1
Lisina	1,12	1,02	0,98	0,76	4,7
Cistina	0,16	0,12	0,13	0,10	0,2
Metionina	0,31	0,29	0,02	0,01	0,8
Fenilalanina	0,47	0,41	0,44	0,34	2,6
Tirosina	0,39	0,29	0,21	0,19	0,9
Treonina	0,54	0,49	0,42	0,33	2,5
Aminoácidos	Fração aquosa				
	STT1	STT2	SBT1	SBT2	Difco*
Triptofano	n.d.**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prolina	0,51	0,52	0,70	0,58	n.d.
Valina	0,67	0,60	0,65	0,49	2,8
Histidina	0,33	0,29	0,26	0,20	0,8
Serina	0,53	0,48	0,51	0,39	3,9
Taurina	0,28	0,27	0,13	0,10	n.d.
Proteína Bruta	11,72	11,16	14,16	10,82	16,00

STT1: Silgem de tilápia com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g $100g^{-1}$; STT2: Silagem de tilápia com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g $100g^{-1}$; SBT1: Silagem de beijupirá com Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + 0,02g $100g^{-1}$; SBT2: Silagem de beijupirá com Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g $100g^{-1}$.

* Fonte: Poermono e Buckle (2002).

**n.d. = Não detectados

Valores representam as médias (n=3).

As frações aquosas utilizadas como peptonas testes apresentaram a composição de proteína total na faixa de 10,82 a 14,16 g 100g⁻¹, sendo menor do que o valor encontrado na peptona comercial. O mesmo foi observado por Poermono e Buckle (2002), analisando peptona de vísceras de arraia (*Trygon sephen*) elaborada a partir de silagem ácida.

A composição em aminoácidos das frações aquosas tanto das silagens de tilápia, quanto das silagens de beijupirá, nos diferentes tratamentos, apresentaram 18 aminoácidos. Os valores encontrados para todas as amostras apresentaram-se menores do que os encontrados na peptona comercial (Difco).

O ácido glutâmico, a lisina, a glicina e o ácido aspártico apresentaram os maiores valores em relação aos demais, em ambos os tratamentos da silagem de tilápia e de beijupirá (Tabela 6.2). Isto pode ser observado nos estudos de Poermono e Buckle (2002), que analisaram peptona de vísceras de arraia (*Trygon sephen*) elaborada a partir de silagem ácida e obtiveram teores maiores para o ácido glutâmico, o ácido aspártico, a glicina e a lisina, corroborando com o presente estudo. Raa e Gildberg (1976), estudando silagem de vísceras de bacalhau (*Gadus morhua*), observaram que a cistina apresentou-se em baixa concentração, indicando que este aminoácido pode ser limitante na fração aquosa. Para estes autores, a cistina e os aminoácidos aromáticos como tirosina e fenilalanina, concentram-se no sedimento da silagem, estando, desta forma, em menores quantidades na fração aquosa, o que pode ser observado no presente estudo (Tabela 6.2). Para Oetterer (1994) a fenilalanina e a tirosina são levemente solúveis em solução aquosa e o teor de lisina aumenta após uma semana de armazenamento da silagem ao ambiente.

Todos os aminoácidos essenciais estão presentes nas frações aquosas obtidas das silagens de tilápia e beijupirá, demonstrando seu alto valor biológico. O mesmo foi observado nos estudos de Anbe (2011), analisando fração aquosa obtida de silagem de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), onde verificou-se a presença de todos os aminoácidos essenciais.

Gildberg (2010) obteve peptonas de alta qualidade, via produção de hidrolisado de vísceras de bacalhau, com ação do ácido fórmico. Para o autor esta é uma fonte de nitrogênio viável, pois este elemento é o componente mais caro do meio de crescimento microbiano.

6.2.7.3 Detecção do crescimento microbiano por Densidade Ótica

Para a construção das curvas de crescimento dos micro-organismos em peptona comercial, ilustradas na Figura 6.2 a seguir, a leitura da densidade ótica em espectrofotômetro foi correlacionada com o tempo de incubação.

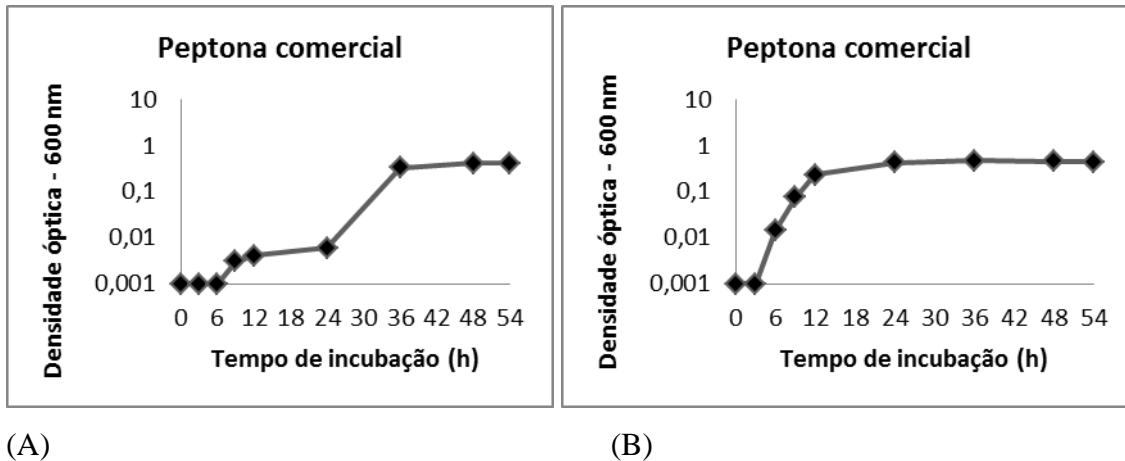


Figura 6.2 - Curvas de crescimento para *Escherichia coli* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) cultivadas em peptona comercial

As curvas de crescimento obtidas nas leituras de absorvância da peptona comercial serviram de parâmetro comparativo para análise da efetividade do crescimento microbiano em peptonas de silagens de tilápia e beijupirá em diferentes tratamentos.

As curvas de crescimento obtidas com as peptonas de silagens de tilápia (STT1 e STT2) e beijupirá (SBT1 e SBT2) para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão demonstradas nas Figuras 6.3 e 6.4, respectivamente.

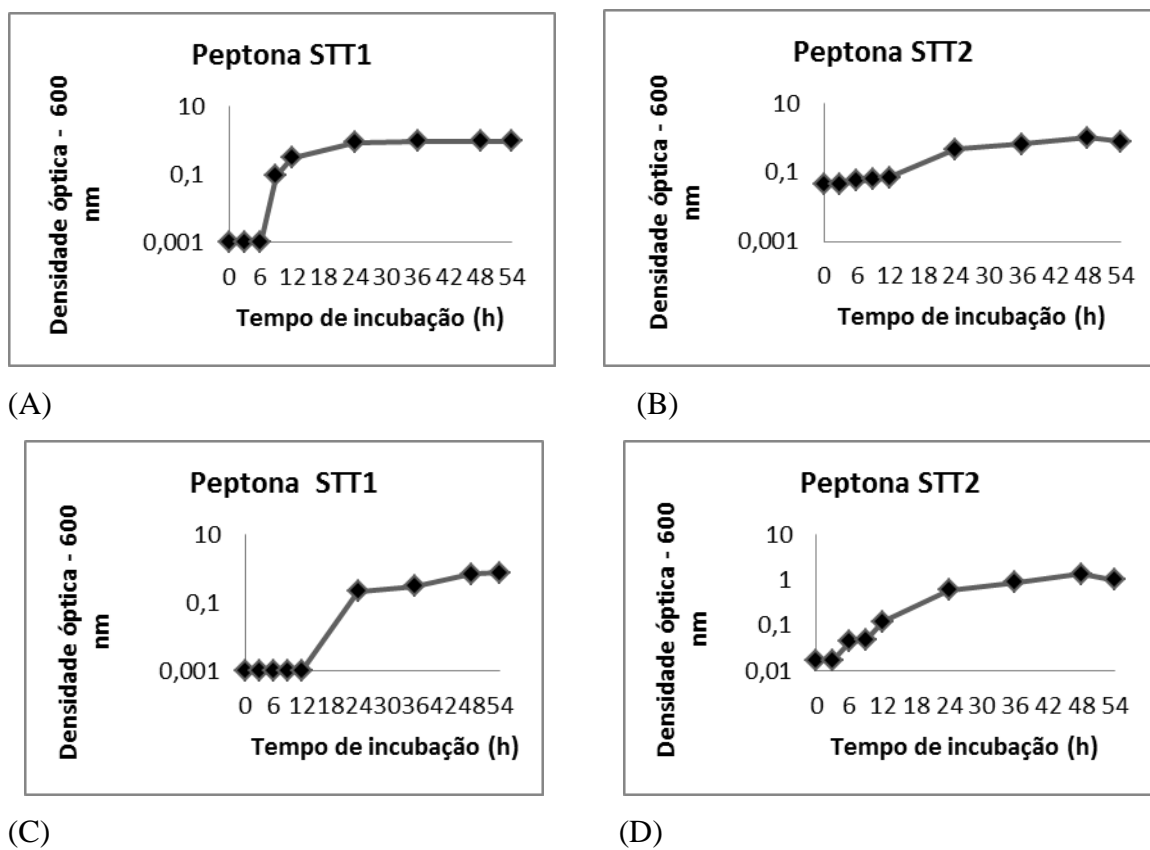


Figura 6.3 - Curvas de crescimento para *Escherichia coli* (A e B) e *Staphylococcus aureus* (C e D), cultivadas em peptona obtida das silagens de tilápia, nos diferentes tratamentos

STT1: Silagem de tilápia de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; STT2: Silagem de tilápia de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹.

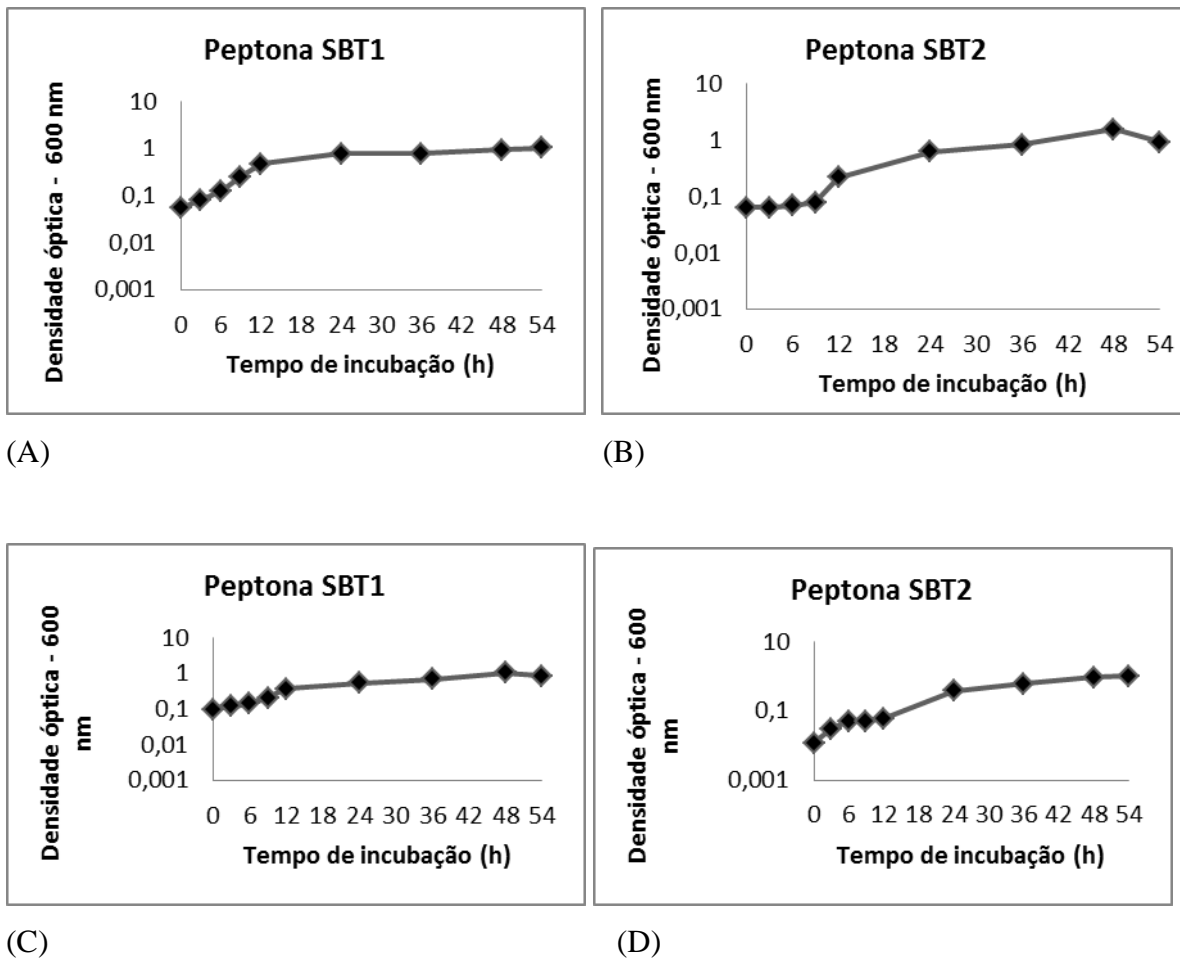


Figura 6.4 - Curvas de crescimento para *Escherichia coli* (A e B) e *Staphylococcus aureus* (C e D), cultivadas em peptona obtida das silagens de beijupirá, nos diferentes tratamentos

SBT1: Silagem de beijupirá de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹;
 SBT2: Silagem de beijupirá de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹.

Para a peptona STT1 (Figura 3A) a *Escherichia coli* atingiu a fase exponencial de crescimento (fase log) depois de 6 horas, a estabilidade (fase estacionária) efetivou-se quando completadas 24 horas de incubação. Para a peptona STT2 (Figura 6.3B), a *fase log* foi atingida após 12 horas de incubação. Após 48 horas, essa mesma peptona apresentou uma queda na curva de crescimento da *Escherichia coli*. A peptona STT1 (Figura 6.3C) apresentou crescimento exponencial para *Staphylococcus aureus* após 12 horas de incubação e a estabilidade do crescimento se deu, após 24 horas, aproximadamente. O crescimento do mesmo micro-organismo se deu de maneira distinta na peptona STT2 (Figura 6.3D). No segundo tratamento, a *fase log* foi atingida efetivamente após 12 horas, semelhante ao que ocorreu em alguns dos tratamentos com *Escherichia coli*. Na peptona STT2, a curva de crescimento ocorreu até 48 horas.

Para as peptonas obtidas da silagem de beijupirá, na peptona SBT1 (Figura 6.4A), a fase log da *Escherichia coli* foi expressiva a partir de 12 horas. O mesmo ocorreu com a peptona SBT2 (Figura 6.4B), porém nessa segunda, observou-se um declínio do crescimento após 48 horas de incubação da respectiva bactéria. Na peptona SBT1 (Figura 6.4C), a curva de crescimento para *Staphylococcus aureus* foi semelhante a da peptona SBT2 (crescimento exponencial após 12 horas e declínio a 48 horas de incubação). Para este último tratamento, o crescimento exponencial ocorreu após 12 horas de incubação, no tempo seguinte foi atingida a estabilidade, sem aparente declínio na curva de crescimento.

De acordo com Ingraham (2010), o crescimento exponencial não pode continuar por muito tempo. O número crescente de células utiliza os nutrientes e produz resíduos em taxas sempre crescentes. Geralmente um nutriente essencial acaba. Às vezes, os produtos tóxicos interrompem o crescimento. Qualquer que seja a causa, a taxa de crescimento diminui em velocidade e, eventualmente, chega a parar. Então, a cultura passa da fase exponencial (também chamada de fase logarítmica ou fase log) de crescimento para a fase estacionária. O mesmo autor afirma que as células mudam à medida que passam da fase exponencial para a fase estacionária. Elas ficam menores e começam a sintetizar componentes para sobreviver, já que não podem crescer mais. Ocorre também alteração na composição de alguns ácidos graxos em suas membranas. Apesar dessas mudanças, culturas em fase estacionária começam a morrer depois de um dia ou mais. A cultura entra na fase de declínio (morte). Durante a fase de declínio, as células da maioria das espécies microbianas morrem exponencialmente. Porém, a taxa de declínio é muito mais baixa que a taxa de aumento de células durante a fase log.

Em testes, Poernomo e Buckle (2002) demonstraram que peptonas provenientes de vísceras de pescado foram eficazes para o crescimento de micro-organismos, tanto em populações mistas, em uma variedade de alimentos, como individualmente. A capacidade destas peptonas para promover o crescimento de micro-organismos foi comparável às peptonas comerciais, analisando-se a taxa de crescimento e de biomassa seca na execução do teste.

Os experimentos realizados com silagem de tilápia e beijupirá também apresentaram resultados satisfatórios para as peptonas, quando comparadas à peptona comercial da marca Difco. Porém a fase inicial, que antecede a fase exponencial de crescimento dos micro-organismos, mostrou-se diferente do experimento de Poernomo e Buckle (2002). A fase inicial (fase lag) de incubação das peptonas de silagem de tilápia e beijupirá foi mais extensa; isso pode ter acontecido porque a peptona proveniente de vísceras é considerada um meio

pobre frente ao BHI, o meio de cultura utilizado para a reativação dos micro-organismos. Quando há a transferência de inóculo de um meio rico para um meio pobre, espera-se uma extensão da fase lag, necessária para que os micro-organismos se adaptem e tornem-se metabolicamente ativos (TORTOTA et al., 2010).

6.2.7.4 Detecção por Plaqueamento

Os resultados da detecção por plaqueamento do crescimento microbiano das peptonas testes e da peptona comercial, diluídos até 10^{-5} estão demonstrados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Detecção por plaqueamento do crescimento microbiano cultivados em peptonas testes e peptona comercial, diluídos até 10^{-5} , em (UFC g^{-1})

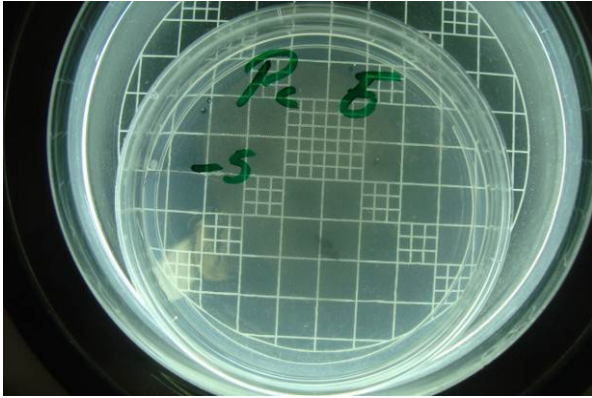
Peptonas	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
STT1	Incontável	Incontável
STT2	Incontável	Incontável
SBT1	Incontável	Incontável
SBT2	Incontável	Incontável
PC	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$

STT1: Silagem de tilápia de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02g\ 100g^{-1}$; STT2: Silagem de tilápia de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02g\ 100g^{-1}$; SBT1: Silagem de beijupirá de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02g\ 100g^{-1}$; SBT2: Silagem de beijupirá de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT $0,02g\ 100g^{-1}$; PC: Peptona comercial (Difco).

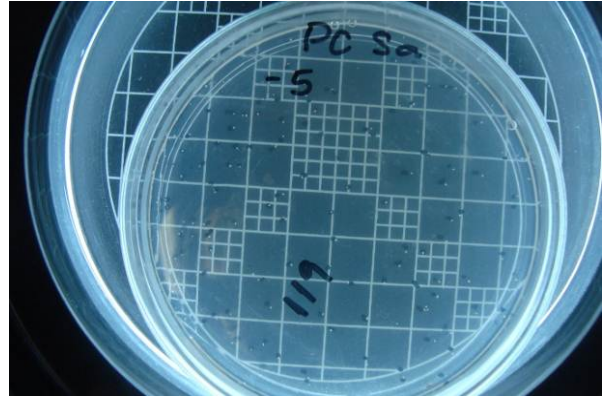
A detecção por plaqueamento apresentou-se incontável para todos os tratamentos, para as diluições até 10^{-5} , demonstrando que as peptonas testes forneceram substratos suficientes para o crescimento de ambos os micro-organismos testados.

Não foi encontrado, na literatura recente, trabalhos que demonstrassem a efetividade do crescimento microbiano por plaqueamento, porém, estes dados deram suporte para afirmar que as peptonas testadas supriram as necessidades de nitrogênio para o crescimento dos micro-organismos de interesse tanto quanto a peptona comercial testada.

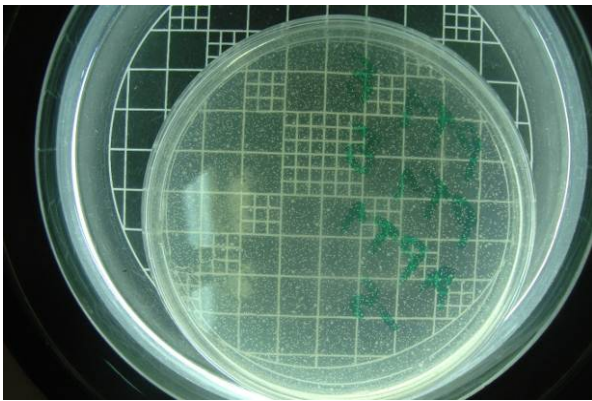
A Figura 6.5 ilustra o crescimento dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* nas peptonas testes (STT1, STT2, SBT1 e SBT2) e para a peptona comercial (PC).



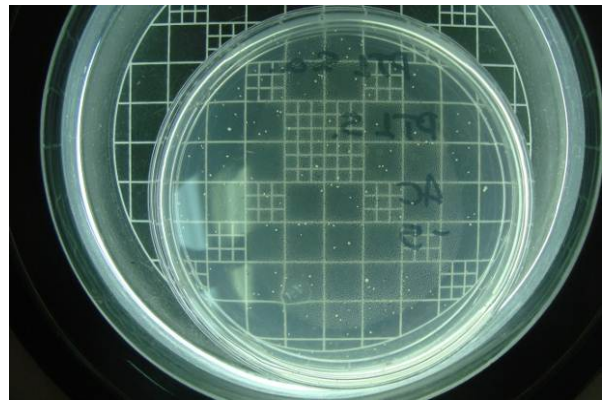
(a)



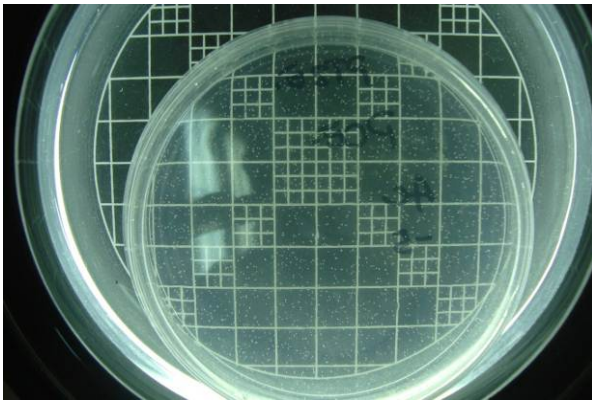
(b)



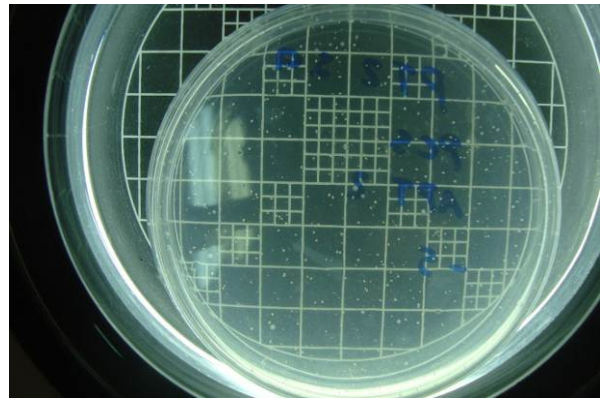
(c)



(d)



(e)



(f)

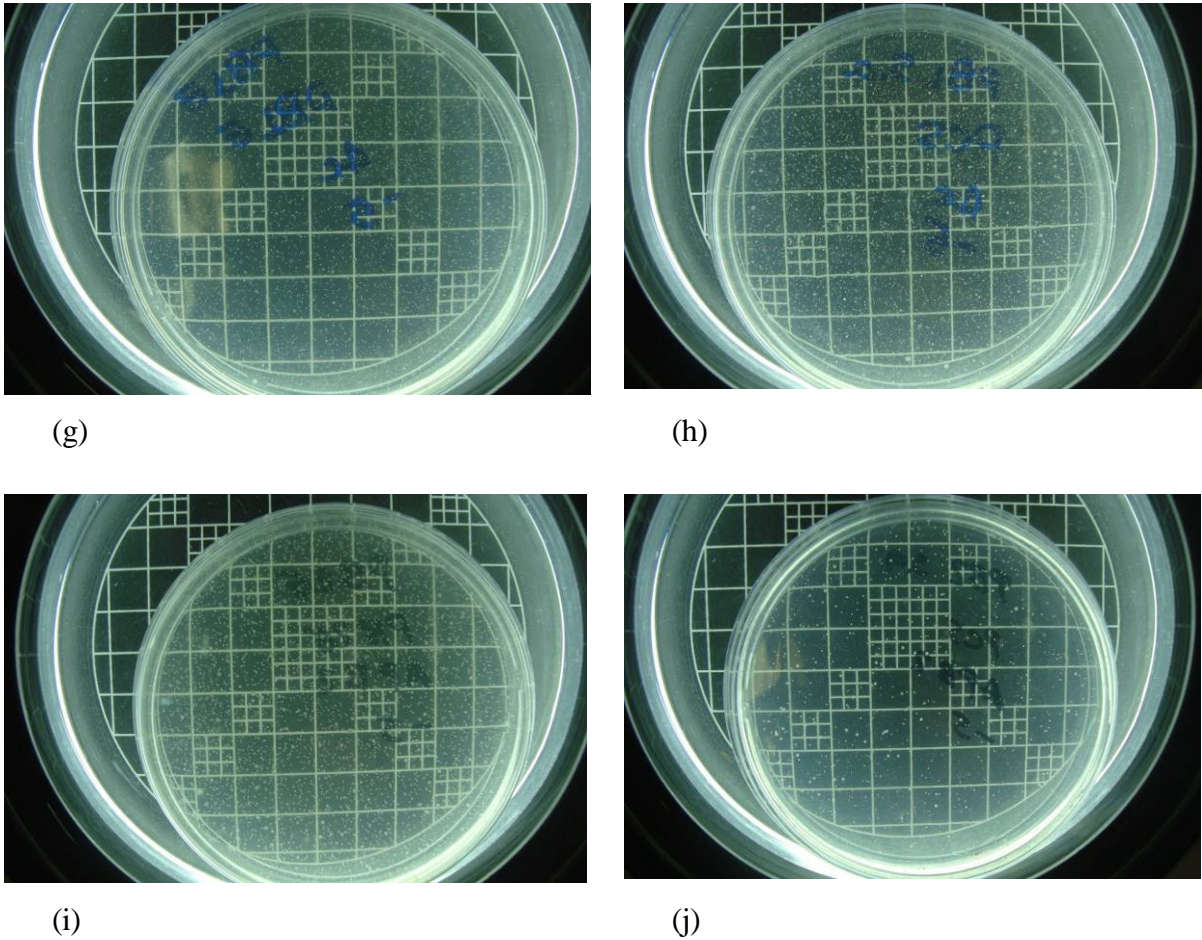


Figura 6.5 - Plaqueamento de crescimento microbiano cultivados em peptonas testes e peptona comercial, diluição 10^{-5} . (a) PC: Peptona comercial, *Escherichia coli*; (b) PC: Peptona comercial, *Staphylococcus aureus*; (c) Peptona STT1, *Escherichia coli*; (d) Peptona STT1, *Staphylococcus aureus*; (e) Peptona STT2, *Escherichia coli*; (f) Peptona STT2, *Staphylococcus aureus*; (g) Peptona SBT1, *Escherichia coli*; (h) Peptona SBT1, *Staphylococcus aureus*; (i) Peptona SBT2, *Escherichia coli*; (j) Peptona SBT2, *Staphylococcus aureus*

6.2.7.5 Produção de biomassa

Os resultados da produção de biomassa do crescimento microbiano cultivados em peptonas testes e peptona comercial estão demonstrados na Figura 6.6.

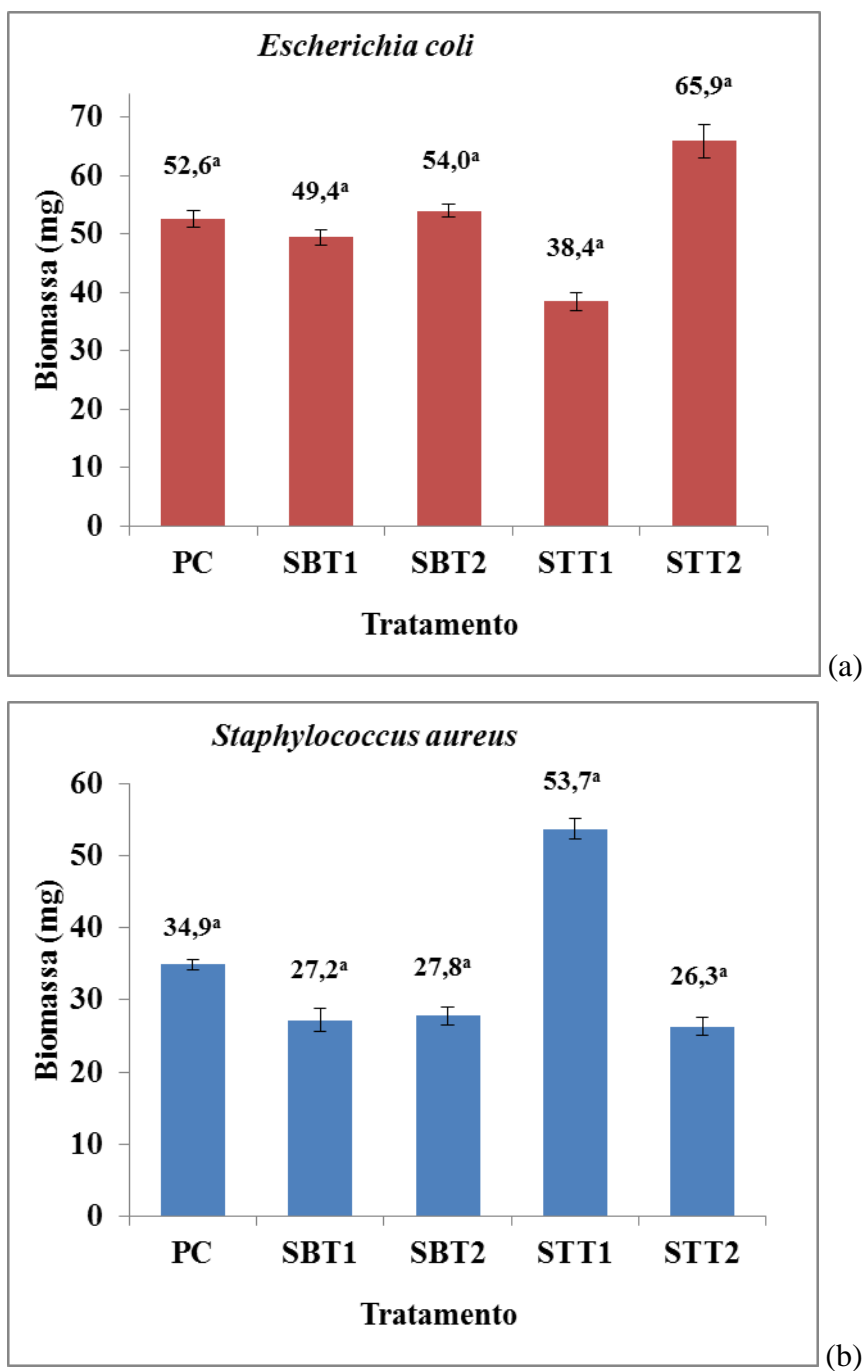


Figura 6.6 – Produção de biomassa para crescimento de (a) *Escherichia coli* e (b) *Staphylococcus aureus* para as peptonas testes e peptona comercial

STT1: Silagem de tilápia de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; STT2: Silagem de tilápia de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT1: Silagem de beijupirá de Ácido cítrico + Ácido Fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; SBT2: Silagem de beijupirá de Ácido propiônico + Ácido fórmico (1:3), 3% v/m + BHT 0,02g 100g⁻¹; PC: Peptona comercial (Difco).

Conforme os resultados, a produção de biomassa do crescimento de *Escherichia coli* mostrou-se na faixa de 38,4 a 65,9 mg biomassa 100mL⁻¹ para todos os tratamentos testados. Para o crescimento de *Staphylococcus aureus* a faixa foi de 26,3 a 53,7 mg biomassa 100mL⁻¹ para todos os tratamentos testados. Pode-se observar que para ambos os micro-organismos avaliados, todos os tratamentos das peptonas testes (STT1, STT2, SBT1 e SBT2) não tiveram diferença estatística com relação à produção de biomassa quando comparado à peptona comercial (Difco). Isto demonstra que as peptonas testes como meios microbianos foram efetivas no crescimento, fornecendo as principais fontes de nitrogênio e carbono para o desenvolvimento destes microrganismos de interesse.

Viera et al. (2005) estudando peptonas elaboradas com resíduos de lagosta (*Panulirus argus* e *Panulirus laevicauda*) e camarão (*Macrobrachium amazonicum*) observaram uma boa produção de biomassa de *Escherichia coli* resultante da utilização destas peptonas quando comparado com o controle (peptona comercial – OXOID). Poernomo e Buckle (2002), estudando peptonas elaboradas com resíduos de vísceras de arraia (*Trygon sephen*) observaram quantidades de biomassa produzidas por cinco diferentes micro-organismos, dois deles testados neste experimento, maiores para a peptona de vísceras do que as peptonas comerciais testadas como controle, sendo que estes resíduos podem ser convertidos facilmente em peptonas, corroborando com os resultados encontrados neste estudo de que as peptonas elaboradas de resíduos de pescado fornecem substratos suficientes para o desenvolvimento microbiano.

6.3 Considerações Finais

As frações aquosas obtidas das silagens de tilápia e beijupirá podem ser convertidas em peptonas pelo processo de fracionamento seguido de liofilização. As peptonas deram suporte para o crescimento dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo este crescimento compatível com a peptona comercial estudada.

A fração aquosa das silagens tanto de tilápia, quanto de beijupirá, apresentaram teores mais elevados de ácido glutâmico, lisina, glicina e ácido aspártico, porém os valores para todos os aminoácidos listados foram menores do que os da peptona comercial.

É possível produzir os coprodutos peptona de tilápia e peptona de beijupirá, com valor agregado, incentivando a reciclagem dos resíduos gerados nas unidades processadoras. Entretanto, como todo novo produto, pesquisas e investimentos se tornam fundamentais para estabelecimento do produto em escala comercial, custo de produção e o valor de mercado.

Este estudo dispõe o procedimento operacional de forma padronizada para elaboração do novo produto (Anexo C).

Referências

ALVERSON, D.L.; FREEBURG, M.H.; MURAWSKI, S.A.; POPE, J.G. **A global assessment of fisheries bycatch and discards**. Rome: FAO, 1996. 233 p. (FOA: Fisheries Technical Paper, 339).

ANBE, L. **Prospecção de componentes bioativos em resíduos do processamento do pescado visando à sustentabilidade da cadeia produtiva**. 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ANDERSON, D.W.J.; FELLERS, C.R. Preparation of sterile fish muscle press juice for chemical and bacteriological studies. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 3, p. 274, 1949.

AYER, N.; COTÉ, R.P.; TYEDMERS, P.H.; WILLISON, J.H.M. Sustainability of seafood production and consumption: an introduction to the special issue. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 17, n. 3, p. 321-324, 2009.

BANCO NORDESTE. **Manual de impactos ambientais**. Orientações básicas sobre aspectos ambientais de atividades produtivas. Fortaleza: Banco do Nordeste, 1999. 297 p.

BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO - BNDS. **Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: www.bndes.gov.br. Acesso em: 10 jan. 2014.

BARRETO, P.L.H.; BEIRÃO, L.H. Influência do amido e carragena nas propriedades texturiais de surimi de tilápia (*Oreochromis* sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 183-188, 1999.

BEERLI, E.L.; Beerli, K.M.C.; LOGATO, P.V.R. Silagem ácida de resíduos de truta (*Oncorhynchus mykiss*), com a utilização de ácido muriático. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 195-198, 2004.

BEIRÃO, L.H. **Curso de Tecnologia para Aproveitamento Integral do Pescado, 2**. Campinas: ITAL/CTC, 2003. 79 p.

BELLO, R.A. **Experiências com ensilado de pescado em Venezuela**. Caracas: Universidad Central de Venezuela, 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/livestock/aphp134/cap1.html>. Acesso em: 23 dez. 2014.

BENITES, C.I. **Farinha de silagem de resíduo de pescado: elaboração, complementação com farelo de arroz e avaliação biológica em diferentes espécies**. 2003. 159 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos). – Departamento de Química, Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 2003.

BOMBARDELLI, R.A.; SYPERRECK, M.A.; SANCHES, E.A. Situação atual e perspectiva para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 181-195, 2005.

BORGHESI, R. **Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BORGHESI, R.; FERRAZ DE ARRUDA, L. F.; OETTERER, M. A silagem de pescado na alimentação de organismos aquáticos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 329-339, 2007.

BORGHESI, R.; PORTZ, L.; OETTERER, M.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v.14, n. 3, p. 242-248, 2008.

BOSCOLO, W.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem tailandesa e comum, nas fases iniciais e crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Lei nº 9605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 fev. 1998.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Plano Mais Pesca e Aquicultura**. Brasília, DF, 2008. Disponível em: <www.mpa.gov.br>. Acesso em: 05 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil, 2010. Disponível em: <www.mpa.gov.br>. Acesso em: 05 jan. 2013.

CATCHPOLE, T.L.; GRAY, T.S. Reducing discards of fish at sea: a review of European pilot projects. **Journal of Environmental Management**, London, v. 91, n. 3, p. 717-723, 2010.

CHO, S.S.; LEE, H.K.; YU, C.Y.; KIM, M.J.; SEONG, E.S.; GHIMIRE, B.K.; SON, E.H.; CHOUNG, M.G.; LIM, J.D. Isolation and Characterization of bioactive peptides from Hwangtae (*yellowish dried Alaska Pollack*) protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Nutrition**, London, v. 13, n. 3, p. 196-203, 2008.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC. **Comunicação from the Comissão to the Council and European Parliament: promoting more environmentally-friendly measures – the role of technical conservation measures**. Bruxelas, 2004. 438 p.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002. 580 p.

DAPKEVICIUS, M.L.E.; BATISTA, I.; NOUT, M.J.R.; ROMBOUTS, F.M.; HOUBEN, J.H. Lipids and protein changes during the ensilage of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) by acid and biological methods. **Food Chemistry**, Barking, v. 63, n. 1, p. 97-102, 1998.

DAUKSAS, E.; FALCH, E.; SLIZYTE, R.; RUSTAD, T. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2659-2670, 2005.

DEGUARA, S.; JEUNCEY, K.; AGLUS, C. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. **Journal of Fish Biology**, London, v. 62, n. 5, p. 1033-1043, 2003.

DeSIMONE, L.D.; POPOFF, F. **Eco-efficiency: the business link to sustainability**. Cambridge: MIT Presse; 1997.

DERAZ, S.F.; EL-FAWAL, G.F.; ABD-ELLATIF, S.A.; KHALIL, A.A. Autohydrolysed *Tilapia nilotica* vish viscera as a peptone source in bacteriocin production. **Indian Journal Microbiological**, New Delhi, v. 51, n. 2, p. 171-175, 2011.

DONG, F.M.; FAIRGRIEVE, W.T.; SKONBERG, D.I.; RASCO, B.A. Preparation and nutrient analyses of lactic acid bacteria ensiled salmon viscera. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 109, n. 4, p. 351-366, 1993.

DUFOSSÉ, L.; DE LA BROISE, D.; GUERARD, F. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: A new method based on Gompertz modeling of microbial growth. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2001.

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J.P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2327-2332, 2006.

ESPE, M.; RAA, J.; NJAA, L.R. Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 49, p. 259-270, 1989.

ESPE, M.; SVEIER, H.; HOGOY, I.; LIED, E. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 174, n. 2, p. 119-137, 1999.

ESPÍNDOLA FILHO, A.; OETTERER, M.; TRANI, P.E. Processamento agroindustrial de resíduos de peixes, camarões, mexilhões e ostras pelo sistema cooperativo. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 52-61, 2001.

FAO. **Animal feed resources information system (AFRIS)**. Roma, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/livestock/agap/frg/AFRIS/default.htm>>. Acesso em: 03 jan. 2014.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2008 (SOFIA)**. Roma: FAO, 2009. 196 p.

FELTES, M.M.C.; CORREIA, J.F.G.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; NINOW, J.L.; SPILLER, V.R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.

FERNANDES, J.B.K.; BUENO, R.J.; RODRIGUES, L.A.; FABREGAT, T.E.H.P.; SAKOMURA, N.K. Silagem ácida de resíduos de filetagem de tilápias em rações de juvenis de piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 29, n. 3, p. 339-344, 2007.

FERRAZ DE ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; BRUM, A.; D'ARCE, M.A.B.R.; OETTERER, M. Nutritional aspects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) silage. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 749-753, 2006.

FERRAZ DE ARRUDA, L.; BORGHESI, R.; PORTZ, L.; CYRINO, J.E.P.; OETTERER, M. Fish silage in black bass (*Micropterus salmoides*) feed as an alternative to fish meal. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 5, p. 879-886, 2009.

FIORI, M.G.S.; SCHOENHALS, M.; FOLLADOR, F.A.C. Análise da evolução tempo-eficiência de duas composições de resíduos agroindustriais no processo de compostagem aeróbica. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 5, n. 3, p. 178-191, 2008.

FURLAN, E.F.; OETTERER, M. Hidrolisado protéico de pescado. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, v. 10, n. 19, p. 79-89, 2002.

GARCIA-CARRENO, F.L.; HERNANDEZ-CORTES, M.P.; HAARD, N.F. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 7, p. 1456-1461, 1994.

GERON, L.J.V.; ZEOULA, L.M.; VIDOTTI, R.M.; MATSUSHITA, M.; KAZAMA, R.; CALDAS NETO, S.F.; FERELI, F. Chemical characterization, dry matter and crude protein degradability and vitro intestinal digestion of acid and fermented silage from tilapia filleting residue. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 136, n. 3-4, p. 226-239, 2007.

GILDBERG, A.; BATISTA, I.; STROM, E. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 11, p. 413-423, 1989.

GILDBERG, A.; DAHL, R.; MIKKELSEN, H.; NILSEN, E.K. Peptones from Atlantic Cod stomach as a nitrogen sources in growth media to marine bacteria. **Journal Aquatic Food Product Technology**, London, v. 19, n. 2, p. 75-83, 2010.

GODDARD, J.S.; AL-YAHYAI, D.S.S. Chemical and nutritional characteristics of dried sardine silage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, London, v. 10, n. 4, p. 39-50, 2001.

GODDARD, J.S.; PERRET, J.S.M. Co-drying fish silage for use in aquafeeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 118, p. 337-342, 2005.

GORMLEY, T.R. Fish a functional food. **Food Science and Technology**, London, v. 20, n. 3, p. 25-28, 2006.

GUERARD, F.; GUIMAS, L.; BINET, A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam v. 19-20, p. 489-498, 2002.

GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. Marine oils: fish and whale oils. In: GUNSTONE, F.D. **The lipid handbook**. London: Chapman & Hall, 1994. cap. 3, p. 167-171.

HARDY, R.W.; SHEARER, K.P.; STONE, F.E.; WIEG, D.H. Fish silage in aquaculture diets. **Journal of World Mariculture Society**, Baton Rouge, v. 14, n. 1, p. 695-703, 1983.

HASSAN, T.E.; HEATH, J.L. Chemical and nutritive characteristics of fish silage produced by biological fermentation. **Biological Wastes**, Barking, v. 20, n. 3, p. 187-201, 1987.

HARVEY, R.A.; CHAMPE, P.C.; FISHER, B.D. Resumos dos microrganismos de impacto clínico. In: _____. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 32, p. 331.

ILES, A. Making the seafood industry more sustentable: creating production chain transparency and accountability. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 15, n. 6, p. 577-589, 2007.

INGRAHAM, J.L.; INGRAHA C.A. Crescimento de micro-organismos. In: _____. **Introdução à microbiologia: uma abordagem baseada em estudos de casos**. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. cap. 8, p. 199., pag 199. 3ª edição norte-americana. 723p.

JACKSON, A.J.; KERR, A.K.; COWEY, C.B. Fish silage as a dietary ingredient for salmon. I. Nutritional and storage characteristics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 211-220, 1984.

JACOBSEN, C. Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: a multidisciplinary challenge. **Annals of the New York Academy Science**, New York, v. 1190, p. 141-150, 2010.

JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A.S. Utilization of byproducts and waste material from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, India, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JORGE, S. **Desenvolvimento de macarrão a base de pescado lavado, desodorizado (surimi) destinado à alimentação institucional e avaliação da sua qualidade protéica**. 1997. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

JUN, S.; PARK, P.; JUNG, W. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research & Technology**, Heidelberg, v. 219, n. 1, p. 20–26, 2004.

KADAM, S.U.; PRABHASANKAR, P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. **Food Research International**, Amsterdam, v. 43, p. 1975-1980, 2010.

KELLEHER, K. **Discards in the world's marine fisheries: an update**. Rome: FAO, 2005. 131 p. (FAO Fisheries Technical Paper).

KIM, S.K.; MENDIS, E. Bioactive compounds from marine processing by products – a review. **Food Research International**, Amsterdam, v. 39, n. 4, p. 383-393, 2006.

KOMPIANG, I.P. Fish silage: its prospect and future in Indonesia. **Indonesia Agriculture Research & Development Journal**, Jakarta, v. 3, n. 1, p. 9-12, 1981.

KUHN, C.R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; VENDRUSCOLO, J.L.; SOARES, G.J.D. Surimi of king weakfish (*Macrodon ancylodon*) wastes: texture gel evaluation with protease inhibitors and transglutaminase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 6, p. 895-901, 2004.

KUHN, C.R.; SOARES, G.J.D.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; VENDRUSCOLO, J.L. Avaliação da força de gel de surimi de resíduos de pescada-foguete (*Macrodon ancylodon*) enriquecido com aditivos protéicos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 239-248, 2003.

LEE, C.F. Processing fish meal and oil. In: STANSBY, E.M. **Industrial fishery technology**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1963. cap. 16, p. 219-235.

LIASET, B.; JULSHAMN, K.; ESPE, M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1747-1759, 2003.

LIEN, L.V.; PHUNG, N.T.; LY, L.V. Ensiled fish by-products as a protein supplement for fattening pigs. In: WORKSHOP-SEMINAR MAKING BETTER USE OF LOCAL FEED RESOURCES, 2000, Cantho. **Resumes...** Cantho: SAREC/UAF, 2000.

LINDGREN, S.; PLEJE, M. Silage fermentation on fish waste products with lactic acid bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 34, p. 1057-1067, 1983.

LO, K.V.; LIAO, P.H.; GAO, Y. Effects of temperature on silage production from salmon farm mortalities. **Bioresource Technology**, Essex, v. 44, n. 1, p. 33–37, 1993.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, p. 761-770, 2006.

MIRANDA, F. F.; PORTO, M. R. A.; PACHECO, R. S.; HERNÁNDEZ-PRENTICE, C. Processo tecnológico destinado à obtenção de flocos de corvina (*Micropogon furnieri*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2003, Pelotas. **Resumos**. Pelotas: UFPel, 2003. CD Rom.

MORALES-ULLOA, D.F.; OETTERER, M. Composição em aminoácidos de silagens químicas, biológicas e enzimáticas preparadas com resíduo de sardinha. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 252-258, 1997.

NEVES, R.A.M.; MIRA, N.V.M.; LANFER MARQUEZ, U.M. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 101-108, 2004.

NOLASCO, A.M. **Resíduos da colheira e beneficiamento da caixeta – *Tabebuia cassinoides* (Lam) D.C.**: caracterização e perspectivas. 2000. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

NUNES, S.B. **Estabelecimento de um plano de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC) para Peixe-Sapo (*Lophius piscatorius*) eviscerado e congelado**. 2001. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual do pescado. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 119-134, 1994.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2002. 200 p.

OETTERER, M. **Tecnologia do pescado** – da adoção de técnicas de beneficiamento e conservação do pescado de água doce. Piracicaba: ESALQ/USP, 2003. 13 p.

OLIVEIRA, M.M.; PIMENTA, M. E.S.G.; CAMARGO, A.C.S.; FIORINI, J.E.; PIMENTA, C.J. Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico – Análise bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1218-1223, 2006.

PASCOE, S. **Bycatch management and the economics of discarding**. Rome: FAO, 1997. 137 p. (FAO Fisheries Technical Paper, 370).

PENNINGTON, J.A.T. Food composition databases for bioactive food components. **Journal of Food Composition and Analysis**. San Diego, v. 15, n. 4, p. 419-434, 2002.

PESSATI, M.L. **Aproveitamento dos sub-produtos do pescado**. Itajaí: MAPA/UNIVALI, 2001. 130 p.

PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 11, n. 9, p. 347-356, 2001.

PIMENTEL, C.V.M.B.; FRANCKI, V.M.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Alimentos funcionais: Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 95 p.

PIRES, C.V.; OLIVEIRA M.G.A.; ROSA, J.C.; COSTA, N.M.B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 179-187, 2006.

POERMONO, A.; BUCKLE, K.A. Crude peptone from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 333-340, 2002.

RAA, J.; GIDBERG, A. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 11, p. 619-628, 1976.

RAA, J.; GILDBERG, A. Fish silage: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 16, n. 4, p. 383-419, 1982.

RAO, S.V.R.; DWARAKANATH, C.T.; SARASWATHI, C.R. Preparation and microbiological evaluation of bactopectone from shrimp waste. **Journal of Food Science and Technology**, Heidelberg, v. 17, p. 133-136, 1980.

REECE, P. Control and reduction of free fatty acid concentration in oil recovered from fish silage prepared from sprat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 31, p. 147-155, 1980.

RUXTON, C.H.S.; REED, S.C.; SIMPSON, M.J.A.; MILLINGTON, K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal Human Nutrition Dietetic**, London, v. 17, n. 5, p. 449-459, 2004.

SAFARI, R.; MOTAMEDZADEGAN, A.; OVISSIPOUR, M.; REGENSTEIN, J.M.; GILDBERG, A.; RASCO, B. Use of hydrolysates from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. **Food Bioprocess Technology**, Heidelberg, v. 5, p. 73-79, 2012.

SALES, R.O. **Processamento, caracterização química e avaliação nutricional da silagem da despesca da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em dietas experimentais com ratos**. 1995. 174 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

SANTANA-DELGADO, H.; AVILA, E.; STELO, A. Preparation of silage from Spanish mackerel (*Scomveromorus maculatus*) and its evaluation in broiler diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, n. 2, p. 129-141, 2008.

SEIBEL, N.F.; SOUZA-SOARES, L.A. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 333-337, 2003.

SILVA, H.B.R.; LANDELL FILHO, L.C. Silagem de subprodutos da filetagem de peixe na alimentação de suínos em crescimento – parâmetro de desempenho e organolépticos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 1137-1141, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; dos SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632 p.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of Cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1415-1424, 2005.

SOPHANODORA, P.; BUCKLE, K.A. Production of microbiological peptones from prawn processing waste. In: FOOD CONFERENCE 88, 1988, Bangkok, Thailand. **Food science and technology in industrial development; proceedings...** Bangkok, Thailand, 1988.

SOUISSI, N.; BOUGATEF, A.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; NASRI, M. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. **African Journal of Biotechnology**, Grahamstown v. 8, n. 3, p. 5, p. 451-457, 2009.

STRAUS, E.L.; MENEZES, L.V.T. Minimização de resíduos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 17., 1993, Natal. **Anais...** Natal: ABES, 1993. p. 212-225.

STROM, T.; EGGUM, B.O. Nutritional value of fish viscera silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 32, p. 115-117, 1981.

STROM, T.; RAA, J. Marine biotechnology in Norway. **Journal of Marine Biotechnology**, Norway, v. 1, p. 3-7, 1993.

SUCASAS, L.F.A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado para o desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade na cadeia produtiva**. 2011. 164 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

TATTERSON, I.N.; WINDSOR, M.L. Fish silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 25, n. 1, p. 369-379, 1974.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

TURATTI, J.M. Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. **Food Ingredients**, São Paulo, v. 9, p. 56-57, 2000.

VASILEVA-TONKOVA, E.; NUSTOROVA, M.; GUSHTEROVA, A. New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. **Current Microbiology**, v. 54, p. 54-57, 2007.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. A new marine medium use a different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 35, p. 385-392, 2004.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources factorial and kinetic studies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 605-613, 2006.

VECHT-LIFSHITZ, S.E.; ALMAS, K.A., ZOMER, E. Microbial growth on peptones from fish industrial wastes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 10, p. 183-186, 1990.

VERFAILLIE, H.A.; BIDWELL, R. **Measuring eco-efficiency, a guide to reporting company performance**. Geneva: WBCSD; 2000. 231 p. Disponível em: <<http://www.wbcd.org>>. Acesso em: 03 dez. 2013.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. **Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de Tilápia e sua utilização na alimentação animal**. São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br>>. Acesso em: 03 jan. 2012.

VIDOTTI, R.M.; CARNEIRO, D.J.; VIEGAS, E.M.M. Growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fingerlings fed diets containing co-dried fish silage as replacement of fish meal. **Journal of Applied Aquaculture**, New York, v. 12, n. 4, p. 77-88, 2002.

VIDOTTI, R.M.; VIEGAS, E.M.M.; CARNEIRO, D.J. Amino acid composition of processed fish silage using diferent raw materials. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 105, n. 1-4, p. 199-204, 2003.

VIEIRA, G.H.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; MACRAE, A.; SOUSA, O.V. Peptone preparation from fishing by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. London, v. 85, p. 1235-1237, 2005.

YAMAMOTO, S. M.; SILVA SOBRINHO, A. G.; VIDOTII, R. M.; HOMEM JUNIOR, A. C.; PINHEIRO, R. S. B.; BUZZULINI, C. Desempenho e digestibilidade dos nutrientes em cordeiros alimentados com dietas contendo silagem de resíduos de peixe. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1131-1139, 2007.

7 CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos experimentos realizados pode-se afirmar que os resíduos do processamento de tilápia e de beijupirá podem ser convertidos em silagens químicas e hidrolisados proteicos para produção de coprodutos de alto valor agregado, sendo recomendada a continuação desses estudos para posteriores aplicações destes coprodutos.

Para a obtenção de hidrolisados proteicos as enzimas alcalase e neutrase apresentaram boa capacidade de hidrólise e obtenção das frações dos resíduos de tilápia, sendo sua maior eficiência observada após 2 horas de hidrólise. Identificaram-se os ácidos graxos presentes na fração lipídica dos hidrolisados de tilápia, sendo estes, predominantemente insaturados.

O processo para obtenção de silagem mostrou-se simples e de fácil manuseio, não exigindo equipamentos e procedimentos custosos, sendo, portanto, uma alternativa para obtenção de coprodutos de pescado. A utilização de diferentes concentrações de ácidos para obtenção deste coproduto mostrou-se eficiente para os tratamentos misturas de ácido cítrico: ácido fórmico e ácido propiônico: ácido fórmico, apresentando estabilidade ao longo de 40 dias de armazenamento a temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$).

Os processos para obtenção das silagens de tilápia e beijupirá mostraram-se uma alternativa para se aproveitar os resíduos. Estes coprodutos apresentaram-se pastosos, homogêneos a partir de 48h da elaboração, a temperatura ambiente ($25\pm 1^\circ\text{C}$). O pH se manteve próximo de 4, revelando que os tratamentos garantiram a qualidade do coproduto, pelo período de 40 dias de armazenamento.

Os tratamentos para os quais o BHT não foi adicionado tiveram valores de índice de peróxido elevados, indicando que houve um processo de degradação da fração lipídica presente nas silagens, fato que reafirma a necessidade de se utilizar um antioxidante nas formulações. Houve também um aumento gradual no nitrogênio não proteico durante a hidrólise, ascendendo de forma significativa entre os tempos de armazenamento.

As silagens demonstraram melhores rendimentos das frações aquosas no período de 10 e 20 dias de estocagem. Para a composição de ácidos graxos, tanto para os resíduos, quanto para as silagens observou-se que o ácido oleico apresentou-se em maior quantidade nas frações analisadas.

As frações aquosas obtidas das silagens de tilápia e beijupirá podem ser convertidas em peptonas pelo processo de fracionamento e liofilização. As peptonas deram suporte para o crescimento dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo este crescimento compatível com a peptona comercial estudada.

A fração aquosa das silagens tanto de tilápia, quanto de beijupirá, apresentou teores mais elevados de ácido glutâmico, lisina, glicina e ácido aspártico, porém os valores para todos os aminoácidos listados foram menores do que os da peptona comercial.

É possível produzir os coprodutos peptona de tilápia e peptona de beijupirá, com valor agregado, incentivando a reciclagem dos resíduos gerados nas unidades processadoras. Entretanto, como todo novo produto, pesquisas e investimentos se tornam fundamentais para estabelecimento do produto em escala comercial, o custo de produção e o valor de mercado.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo aceito para publicação (no prelo)

Journal of Aquacult Food Product Technology

The feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste by proteolysis

Ligianne Din Shirahigue^{1*}

¹Center of Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo, 13416-000, Piracicaba, SP, Brazil.

E-mail: ligianneds@yahoo.com.br.

Maira Oliveira Silva²

Aline Cristina Camargo²

Lia Ferraz de Arruda Sucasas²

Ricardo Borghesi³

Ingridy Simone Ribeiro Cabral⁴

Luciana Kimie Savay-da-Silva²

Juliana Antunes Galvão²

Marília Oetterer²

² “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of São Paulo, 13418-900, Piracicaba, Brazil.

³Brazilian Agricultural Research Corporation, 79320-900, Corumbá, Brazil.

⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Chemistry, Federal University of Alfenas-MG

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste using different enzymes and to minimize the periods of hydrolysis to evaluate the performance of the lipid fractions. When processing waste tilapia, commercial enzymes were added that were composed of neutrase and alcalase acting at different hydrolysis times to produce the best yields. The treatment proved feasible for obtaining the protein hydrolysates. The type of enzyme and the hydrolysis time determined the degree of fractionation. The enzymes performed well and the highest efficiency occurring within 2 hours of hydrolysis. The lipid fraction contained significant amounts of polyunsaturated and an adequate n-6/n-3 ratio. The hydrolysis and fractionating, it was possible to obtain byproducts, preserving the physical-chemical characteristics of the oil, a greater yield, and this material can be used in the animal feed.

Keywords: waste, tilapia, yield, lipid fraction, hydrolysis

INTRODUCTION

The constant development of the fish industry generates a large quantity of waste, which means not only considerable quantities of good quality protein are discarded annually but also that environmental pollution is increased (He et al., 2013). This material is underutilized by the industry. It provides nutrients such as proteins, omega-3 fatty acids, phospholipids, cholesterol, and fat soluble vitamins. These waste products also contain bioactive compounds that can contribute to promotion of good health and functional properties when used in future technological applications (Feltas et al., 2010; Rai et al., 2010). Waste that is handled correctly can be processed in the raw material form for secondary processes, such as in commercial products for human consumption (Arruda et al., 2007) or in the preparation of animal feed, fertilizer or chemicals, baits and crafts, as an option for increasing the income of industries (Feltas et al., 2010; Vidal et al., 2011).

The fish protein hydrolyzate can be obtained by hydrolytic processes with the addition of enzymes or with enzymes present in the actual fish (Martins et al., 2009; Silva, 2010). The hydrolysis may influence the functional characteristics of the final product, such as its solubility, water holding capacity, foaming and emulsification (Zavareze et al., 2009), and allows the design of products with predefined functional properties that can be used as ingredients and food additives. Enzymatic hydrolysis can be an effective technique for releasing and extracting fish lipids and their byproducts compared with classical organic extraction and results in better yield (Dumay et al., 2004). Previous studies have shown that, when compared to classical organic extraction, lipid extraction is enhanced by a pre-hydrolysis step using wide-spectrum proteases (Dumay et al., 2004; Dumay et al., 2006) and a part of the oil could be obtain after hydrolysis and centrifugation (Slizyte et al., 2005).

The aim of this work was to evaluate the feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste using different enzymes and to minimize the periods of hydrolysis to evaluate the performance of the lipid fractions.

MATERIAL AND METHODS

Materials

The tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste was provided by filleting fish. Waste consisted of head, viscera, tail, skin, bone and scale. In total, approximately six kg of residue was used. Enzymes used for hydrolysis were provided by Prozyn Industry Ltd. (São Paulo, Brazil).

Chemical analysis of Tilapia waste

Analyses were performed for the determination of the proximate composition of the Tilapia waste. All analysis was performed in triplicate in accordance with Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990).

Enzymatic Hydrolysis and Yield of fractions

The crude tilapia residue was triturated in a CAF grinder (C.A.F. Máquinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil) (Mincer 98 BT, stainless, 3 HP motor) until the formation of a homogeneous mass. This material was distributed into container and the treatments were prepared as follows: T1: E1 x 1 hour hydrolysis; T2: E1 x 2 hour hydrolysis; T3: E1 x 4 hour hydrolysis; T4: E2 x 1 hour hydrolysis; T5: E2 x 2 hour hydrolysis and T6: E2 x 4 hour hydrolysis. The material was homogenized with distilled water (ratio 1/1, w/v). According to technical specifications from supplier (Prozyn, São Paulo), the following parameters to optimal enzyme activity, the mixture was adjusted to pH 7 (with NaOH 1M) and maintained at 55°C. Enzymes (0.5% relative to the waste weight for Alcalase and Neutrase) were added to the mixture and the system was continuously stirred at 300 rpm during the different times. The pH and temperature were monitored and maintained throughout the experiment (digital potentiometer, Digimed). pH was maintained by titration of HCl or NaOH into the hydrolysates. After predetermined hydrolysis time, the containers were subjected to 80°C for 10 minutes to inactivate the enzymes. The hydrolysates were centrifuged (Eppendorf 5810 R Refrigerated Centrifuge) at 17,600 g for 30 minutes. Three layers were obtained (sediment, aqueous and lipid phase) and were stored at -20°C for later analysis (Dumay et al., 2006).

The samples were weighed before and after fractionation. The phases obtained were individually weighed to obtain the yield, which was expressed as a percentage of sediment, lipid and aqueous fraction.

Lipid Extraction

Lipid extraction was performed according to the method described by Folch et al. (1957). Approximately one g of dried material was homogenized in four mL of distilled water. Methanol was added (3:20 v/v), and the samples were subsequently shaken for 30 minutes before the addition of chloroform (3:40 v/v). The system was stirred for 30 minutes before filtration, and 0.9% NaCl was added. After 15 minutes of sedimentation at 4°C in the funnel, the lipids of interest were obtained. The lipid extracts were dried by rotary evaporation (temperature < 35°C) and were later weighed; the results are expressed as g lipid/g dry material. The lipid extracts were stored in 10 mL of chloroform at -80°C until analysis.

Fatty Acid Analysis

The methyl esters were obtained according to the methodology described by Hartman and Lake (1973). In the trans esterification process, the lipid material was homogenized, and approximately 200 mg sample was transferred to test tubes to which five mL of methanolic NaOH was added followed by heating in water at 65-70°C for 15 minutes. Next, 10 mL of an esterification reagent (a solution of ammonium chloride (6g) and sulfuric acid (9 mL) in methanol (180 mL)) was added to the solution and was maintained under heat for 10 minutes. After cooling the sample, 2 mL of petroleum ether was added, and the desired volume was reached using a saturated sodium chloride solution. The fatty acid composition was determined using gas chromatography (Konic - HRGC Model 4000A) with a flame detector and column chromatographic fused silica CP-Sil 88 FAME Tailor Made (Chrompak). Gas chromatography was performed according to AOCS (1998) - methods Ce 1-62, Ce 1b-89, Ce 1c-89. The column temperature was positioned in the range 180-225°C with a heating rate of 1°C per minute, while the temperature of the injector and detector was set at 300°C. The flow rate of the carrier gas (hydrogen) was 0.5 mL/min.

Statistical Analysis

The data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's mean comparison tests were performed using the Statistica Version 11 software (Tulsa, OK, USA). A *p*-value <0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The proximate chemical composition of tilapia waste was: 60.44±0.27 moisture; 4.90±0.61 ash; 14.62±0.79 proteins and 10.75±0.97 lipids.

Enzymatic Hydrolysis and Yield of Fractions

The hydrolysis of tilapia waste protein occurred rapidly under temperature conditions (55°C) and pH (7.0) suitable for enzymatic action, allowing the formation of a light brown soluble product with a mild aroma, characteristic of fish waste. The lipid fraction corresponded on average to 15% of the total hydrolyzate, which can be used to direct this sample for further studies. There were differences (*p* <0.05) in the yield of lipid fraction, with treatments T3 and T5 resulting in higher yields of 21% and 22%, respectively (Table 1). No significant differences (*p* > 0.05) were observed for the sediment yield (Table 1). There were differences (*p* < 0.05) in the yield of the aqueous fraction (soluble), and the opposite results were observed for the lipid fraction, with T3 and T5 producing the lowest amounts of 33% and 28%, respectively (Table 1).

The type of enzyme and the hydrolysis time determined the proportion of the fraction of interest in this case because the enzymes used in the hydrolysis of proteins functioned by exerting their optimum activity in the early hours of hydrolysis (Table 1). According to Silva (2010), alcalase is commonly used in many industries to obtain hydrolyzate so as to not promote objectionable flavor of the product and to provide better physicochemical characteristics and performance, even when the process is intensive hydrolysis.

Fatty Acid Profile of Lipid Fraction

Fish meat has been the subject of numerous studies related to its composition of polyunsaturated fatty acids, which are directly related to human health for their protective effect against cardiovascular disease and, especially, rheumatism (Harris, 1999; Hunter and Roberts, 2000; Uauy and Valenzuela, 2000; Justi et al., 2003; CALDER, 2003). The fatty acid composition present in the lipid fraction of the hydrolyzate is summarized in Table 2. The fatty acids are predominantly unsaturated, with oleic and linoleic acid being present in higher quantities for most of the treatments. Among the saturated fatty acids, palmitic and stearic acids were detected at higher levels, as previously reported for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (El-Husseiny et al., 2010) and catfish (*Pseudoplatystoma* sp.) (Martino et al., 2002). The fatty acid composition of fish may be influenced by many factors, including temperature, salinity and food. Several authors report that the fatty acid composition of muscle tissue reflects the fatty acid composition of the diet (Lee et al., 2003; Durazo-Beltrán et al., 2003; Jobling and Bendiksen, 2003; Justi et al., 2003; Visentainer et al., 2005; Tidwell et al., 2007). In freshwater fish, such as tilapia, it is expected that the content of omega-3 fatty acids is less than that in marine fish. This fact is associated with several factors, among which are the differences related to the biochemistry of the metabolism of essential fatty acids in marine fish and freshwater fish and the composition of the diet in both habitats (Zenebe et al., 1998). Therefore, the results of this study (Table 2) corroborate the results presented by Maia et al. (1998), who evaluated the lipid fraction of residue silage of tilapia, and by Ferraz de Arruda et al. (2009) for use in feeds for aquaculture. These authors evaluated the byproducts obtained from tilapia aquaculture and observed only traces of eicosapentaenoic acid (EPA, C20: 5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, C22: 6n-3). Moreover, in the present study, the values observed for DHA were higher than for EPA, which corroborates the values that were exhibited for other species of freshwater fish (Andrade et al., 1995; Ramos Filho et al., 2008). Although the ideal quantities for fatty acid families n-6 and n-3 have not yet been established, values below four (Department of Health and Social Security, 1994) or five (World Health Organization - WHO, 1994) for the n-6/n-3 ratio are considered desirable for a healthy diet.

The n-6/n-3 ratio of lipid fractions obtained in this research was approximately 1:1. Therefore, all the treatments produced potentially healthy fish oils for human consumption.

According to Simopoulos (1999), the n-6/n-3 ratio in Western diets has ranged from 20:1 to 30:1, values higher than those considered desirable, i.e., 1:1 to 2:1, reported by the authors. If we consider the reason cited by these authors, the lipid fractions can be used for human consumption as a source of polyunsaturated lipids in encapsulated form. The use of these sources proves viable, while the aim of the producer is adding value to fish waste that would be discarded, thereby offering a differentiated product with the proper n-6/n-3 ratio to a growing market in search of sustainable energy sources and healthy diets. Another option would be to use the lipid fractions as energy sources in diets for aquaculture. The lipid sources have high commercial value.

According to studies by Dumay et al. (2009), the hydrolysis time is a significant factor that can influence the attainment of different compounds according to the response of enzyme activity. With hydrolysis, the disruption of tissue obtained at the beginning of proteolysis appears sufficient to release the lipids of interest. This phenomenon is due to the generation of short-chain peptides during extensive hydrolysis, which suggests that peptides having hydrophobic regions made more accessible for interaction with lipids can subsequently be recovered by the centrifugation process. These observations confirm the results obtained in this experiment, where it was observed that for shorter hydrolysis times (1 to 2 hours), the resulting lipid fractions had good fatty acid profiles (Table 2).

CONCLUSION

The processes for obtaining hydrolyzate were simple and easy to use. The neutrase and alcalase enzymes performed well in hydrolysis and generating fractions of tilapia waste, and greater efficiency was observed for shorter times (2 hours). It was possible to identify the fatty acids present in the lipid fraction, which are predominantly unsaturated fatty acids. The production of protein hydrolyzate is an alternative use of tilapia waste. By fractionating, the obtained byproducts can be applied in the preparation of feed, as the lipid fraction treatments yielded significant amounts of polyunsaturated fats and suitable n-6/n-3 ratios.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) for providing a doctoral scholarship and financial support for this work (Case n° 23038.051665/2009-04 - Edital Ciências do Mar).

References

- Andrade, A.D., Rubira, A.F., Matsushita, M., and Souza, N.E. 1995. w3 fatty acids in freshwater fish from south Brazil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 1207-1210.
- Arruda, L. F., Borghesi, R., and Oetterer, M. 2007. Use of fish waste as silage – a review. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 50: 879-886.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. 1995. Official methods of analysis. 14th ed. Washington, DC. 1141 p.
- American Oil Chemist's Society - AOCS. 1998. Official methods of analysis. Methods Ce 1-62, Ce 1b-89, Ce 1c-89. 5th ed. Champaign.
- Calder, P.C. 2003. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 433-446.
- Durazo-Beltrán, E., D'abramo, L.R., Toro-Vazquez, J.F., Vazques-Peláez, C., and Viana, M.T. 2003. Effect of triacylglycerols in formulated diets on growth and fatty acid composition in tissue of green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquac.* 224: 257-270.
- Dumay, J., Barthomeuf, C., and Berge, J.P. 2004. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. *J. Aquat. Fish Prod. Technol.* 13: 69-84.
- Dumay, J.; Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., and Berge, J.P. 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Proc. Biochem.* 41: 2327-2332.
- Dumay, J., Allery, M., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Carbonneaud, M.E., and Berge, J.P. 2009. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) headswith Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. *J. Sci. Food Agric.* 89: 1599-1606.
- El-Husseiny, O.M., Abdul-Aziz, G.M., Goda, A.M.A., and Suloma, A. 2010. Effect of altering linoleic acid and linolenic acid dietary levels and ratios on the performance and tissue fatty acid profiles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fry. *Aquac Intern.* 18: 1105-1119.
- Feltes, M.M.C., Correia, J.F.G., Beirão, L.H., Block, J.M., Ninow, J.L., and Spiller, V.R. 2010. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Amb.* 14: 669-677.

- Ferraz De Arruda, L., Borghesi, R., Portz, L., Cyrino, J.E.P., and Oetterer, M. 2009. Fish silage in black bass (*Micropterus salmoides*) feed as an alternative to fish meal. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 1267-1278.
- Folch, J., Lees, M., and Sloan-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 225 :497-509.
- Harris, W.S. 1999. Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceridemia: focus on fish oils. *Clin. Card.* 22: 40-43.
- Hartman, L., and Lago, R.C. A. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Prac.* 22: 475-477.
- He, S., Franco, C., and Zhang, W. 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Res. Int.* 50: 289–297.
- Hunter, B.J., and Roberts, D.C.K. 2000. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nut. Res.* 20: 1047-1058.
- Jobling, M., and Bendiksen, E.A. 2003. Dietary lipids and temperature interact to influence tissue fatty acid composition of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. *Aquac. Res.* 34: 1423-1441.
- Justi, K.C., Hayashi, C., Visentainer, N.E., Souza, N.E., and Matsushita, M. 2003. The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. *Food Chem.* 80: 489-493.
- Lee, S.M., Lee, J.H., and Kim, K.D. 2003. Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquac.* 225: 269-281.
- Maia, W.M, Nunes, M.L., Figueiredo, M.J., and Bragagnolo, N. 1998. Caracterização da fração lipídica de silagem de resíduo de tilápia para utilização em rações para a aquicultura. In: *Simp. Bras. Aquic.* 2: 55-64.
- Martins, V.G., Costa, J.A.V., and Prentice-Hernández, C. 2009. Hidrolisado proteico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). *Quím. Nova* 32: 61-66.
- Martino, R.C., Cyrino, J.E.P., Portz, L., and Trugo, L.C. 2002. Performance and fatty acid composition of surubim, *Pseudoplatystoma coruscans* fed diets with animal and plant lipids. *Aquac.* 209: 233-246.
- Rai, A. K., Swapna, H.C., Bhaskar, N., Halami, P.M. , and Sachindra, N.M. 2010. Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. *Enz. Microb. Technol* 46: 9-13.

- Ramos Filho, M.M., Ramos, M.I.L., Hiane, P.A., and Souza, E.M.T. 2008. Perfil lipídico de quatro espécies da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 28: 361-365.
- Silva, J.F.X. 2010. Produção e caracterização de hidrolisado proteico provenientes de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiro e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE.
- Simopoulos, A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Amer. J. Clin. Nut.* 70: 560S-569S.
- Sli'zyte, R., Dauksas, E., Storro, I., and Rustad, T. 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morshua*) by-products. *Proc. Biochem.* 40: 1415-1424.
- Tidwell, J.H., Coyle, S., and Bright, L.A. 2007. Effects of different types of dietary lipids on growth and fatty acid composition of largemouth bass. *North Amer. J. Aquac.* 69: 257-264.
- Uauy, R., and Valenzuela, A. 2000. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nut.* 16: 680-684.
- Vidal, J.M.A., Rodrigues, M.C.P., Zapata, J.F.F., and Vieira, J.M.M. 2011. Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. *Rev. Ciên. Agron.* 42: 92-99
- Visentainer, J.V., Saldanha, T., Bragagnolo, N., and Franco, M.R.B. 2005. Relação entre teores de colesterol em filés de tilápia e níveis de óleo de linhaça na ração. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 25: 310-314.
- Zavareze, E. R., Silva, C.M., Mellado, M.S., and Prentice-Hernández, C. 2009. Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. *Quím. Nova* 32: 1739-1743.
- Zenebe, T., Ahlgren, G., and Gustafsson, I.B. 1998. Fatty acid and lipid content on *Oreochromis niloticus* L. in Ethiopian lakes – dietary effects of phytoplankton. *J. Fish Biol.* 7: 146-158.

Table 1. Yield of soluble, insoluble and lipid fractions obtained by fractionation of the protein hydrolyzate of tilapia.

Protein Hydrolyzate	Aqueous fraction (%)	Sediment fraction (%)	Lipid fraction (%)
T1	50±0.07 ^a	42±0.02 ^a	8±0.05 ^b
T2	39±0.08 ^{ab}	44±0.02 ^a	17±0.07 ^a
T3	33±0.08 ^b	46±0.08 ^a	21±0.06 ^a
T4	48±0.03 ^a	43±0.00 ^a	10±0.03 ^b
T5	28±0.03 ^b	50±0,03 ^a	22±0,12 ^a
T6	38±0.08 ^{ab}	49±0.02 ^a	12±0.07 ^b



T1: neutrase enzyme (E1) hydrolysis for 1 hour; T2: neutrase enzyme (E1) hydrolysis for 2 hours; T3: neutrase enzyme (E1) hydrolysis for 4 hours; T4: alcalase enzyme (E1) hydrolysis for 1 hour; T5: alcalase enzyme (E1) hydrolysis for 2 hours; e T6: alcalase enzyme (E1) hydrolysis for 4 hours. Average of triplicates ± standard deviation (SD); values in the same column with different superscript differ by Tukey's test (p<0.05).

Table 2. Fatty acid composition of the residue and the lipid fraction of the hydrolyzate (%)

Fatty acid	Waste	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Myristic (C14:0)	0.94	0.20	3.25	1.95	-	3.26	1.56
Pentadecanoic (C15:0)	0.06	0.04	0.19	0.12	0.21	0.19	0.09
Palmitic (C16:0)	6.66	13.54	23.48	14.35	22.05	23.89	11.59
Heptadecanoic (C17:0)	0.06	0.13	0.21	0.13	0.24	0.20	0.11
Stearic (C18:0)	1.83	4.84	6.43	3.98	5.29	6.63	3.24
Arachidic (C20:0)	0.06	0.29	0.20	0.10	-	0.18	0.11
Heneicosanoic (C21:0)	0.01	0.03	0.03	0.01	-	0.03	0.02
Behenic (C22:0)	-	0.31	0.05	0.01	-	0.05	0.02
Tricosanoic (C23:0)	0.00	0.04	0.02	0.01	-	0.02	0.01
Lignoceric (C24:0)	0.02	0.07	0.30	0.19	0.25	0.30	0.12
<i>Saturated Fat</i>	<i>9.66</i>	<i>19.48</i>	<i>34.15</i>	<i>20.87</i>	<i>28.04</i>	<i>34.81</i>	<i>16.90</i>
Myristoleic (C14:1)	0.02	0.01	0.18	0.09	0.21	0.19	0.09
Palmitoleic (C16:1)	0.77	0.26	5.98	3.66	5.29	6.09	2.94
Oleic (C18:1n9c)	4.45	23.9	34.80	21.69	33.10	35.88	17.51
Cis-Eicosenoic (C20:1)	0.30	0.13	2.26	1.42	2.01	2.36	1.16
<i>Monounsaturated Fat</i>	<i>5.57</i>	<i>23.50</i>	<i>43.22</i>	<i>27.02</i>	<i>40.61</i>	<i>44.60</i>	<i>21.72</i>
Linoleic (C18:2n6c)	0.77	49.65	14.49	8.91	13.21	14.78	7.17
Gamma linolenic (C18:3n6)	0.03	0.03	0.86	0.52	0.72	0.09	0.41
Linolenic (C18:3n3)	0.05	5.87	1.01	0.62	0.86	1.03	0.50
Cis-Eicosadienoic (C20:2)	0.00	0.00	0.07	0.04	0.06	0.06	0.04
Cis-Eicosatrienoic (C20:3n3)	0.01	-	0.14	0.08	-	0.13	0.32
Cis-Eicosatrienoic (C20:3n6)	0.02	-	0.64	0.38	0.49	0.66	0.32
Arachidonic (C20:4n6)	0.03	-	0.89	0.51	0.71	0.88	0.43
Docosadienoic (C22:2n6)	0.16	-	0.02	0.02	-	-	-
Cis-Eicosapentaenoic (C20:5n3)	0.00	-	0.07	0.04	0.29	0.05	0.03
Cis-Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	0.09	-	1.53	0.90	-	1.53	0.65
<i>Poly-Unsaturated Fat</i>	<i>1.16</i>	<i>55.56</i>	<i>19.71</i>	<i>12.02</i>	<i>16.34</i>	<i>19.21</i>	<i>9.61</i>
<i>Trans Fat</i>	<i>0.04</i>	<i>0.00</i>	<i>0.54</i>	<i>0.28</i>	<i>0.00</i>	<i>0.55</i>	<i>0.27</i>
Omega 3	0.15	5.87	2.74	1.64	1.15	2.74	1.24

T1: neutrase enzyme (E1) hydrolysis for 1 hour; T2: neutrase enzyme (E1) hydrolysis for 2 hours; T3: neutrase enzyme (E1) hydrolysis for 4 hours; T4: alcalase enzyme (E1) hydrolysis for 1 hour; T5: alcalase enzyme (E1) hydrolysis for 2 hours; e T6: alcalase enzyme (E1) hydrolysis for 4 hours.

**ANEXO B – Procedimento Operacional Padrão do preparo da silagem química de
pescado**

	Procedimento Operacional Padronizado (POP)	Documento n° 01	N° Folha 157 de 3	
		Emissão: 10/07/14	Revisão 1: 18/07/2014	
POP - Preparo de Silagem Química de Pescado.				

1. Objetivo: obtenção de silagem química de pescado.

2. Descrição: este procedimento deve ser adotado sempre que se deseja realizar a obtenção de silagem química de pescado.

3. Frequência e Responsabilidade: o procedimento deve ser realizado por pessoas treinadas, que tenham conhecimento em utilizar corretamente os equipamentos/utensílios e reagentes envolvidos, tomando os devidos cuidados com os mesmos e com a sua própria segurança.

4. Materiais:

- 4.1. bandejas;
- 4.2. balança digital;
- 4.3. bastão de vidro;
- 4.4. bequer;
- 4.5. espátula;
- 4.6. funil;
- 4.7. proveta;
- 4.8. potenciômetro MS Tecnopon;
- 4.9. picador CAF-98;
- 4.10. pipeta Digipet 5,0 ml;
- 4.11. ponteiros plásticos de 5,0 ml;
- 4.12. piceta com água destilada;
- 4.13. papel absorvente macio;
- 4.14. capela;
- 4.15. Ácido fórmico p.a.;
- 4.16. Ácido propiônico p.a.
- 4.17. Ácido cítrico p.a.

5. Procedimento:

- 5.1. Pesar os resíduos do processamento do pescado;
- 5.2. Colocar os resíduos no equipamento picador para obtenção de uma massa homogênea;
- 5.3. Pesar a massa obtida;
- 5.4. Dividir o material obtido em lotes menores utilizando béquer;
- 5.5. Adicionar a solução ácida escolhida;
- 5.6. Homogeneizar a massa com auxílio do bastão de vidro;
- 5.7. Medir o pH;
- 5.8. Realizar o controle diário do pH até a estabilização;
- 5.9. Manter sob temperatura ambiente;

6. Proporção de ácidos:

- 6.1. Utilizar a proporção de 1:3 do ácido cítrico: ácido fórmico; e adição de 3% do volume/peso da massa;
- 6.2. Utilizar a proporção de 1:3 do ácido propiônico: ácido fórmico, e adição de 3% do volume/peso da massa;



7. Referências:

FERRAZ DE ARRUDA, L. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos.** Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. p.78, 2004.

OETTERER, M. **Curso de conservação e tecnologia do pescado de água doce.** SEBRAE: Cursos Agrozootécnicos. Piracicaba: SEBRAE, 1994. 24 p.

	Responsáveis	Data	Aprovação	Assinatura Gerente Qualidade
Elaboração	Ligianne Din Shirahigue	10/07/2014	Marília Oetterer	
Revisão 1	Ligianne Din Shirahigue	18/07/2014	Marília Oetterer	

ANEXO C – Procedimento Operacional Padrão do preparo de peptona a partir do fracionamento de silagem de pescado.

	<p align="center">Procedimento Operacional Padronizado (POP) de Análises Microbiológicas</p>	<p align="center">Documento nº 02</p>	<p align="center">Nº Folha 159 de 3</p>	
		<p align="center">Emissão: 10/07/14</p>	<p align="center">Revisão 1: 18/07/2014</p>	
<p align="center">POP - Preparo de peptona a partir do fracionamento de silagem de pescado.</p>				

1. Objetivo: Preparo de peptona a partir do fracionamento de silagem de pescado para realizar análise microbiológica.

2. Descrição: A peptona deverá ser utilizada para o preparo das diluições das amostras a serem analisadas. O volume a ser feito depende da quantidade de amostra a ser analisada.

3. Frequência e Responsabilidade: Este procedimento deve ser adotado sempre que se deseja realizar uma análise microbiológica, devendo ser a primeira solução/meio de cultura a ser preparado. Toda a equipe encarregada de realizar as análises microbiológicas é responsável pelo preparo da água salina peptonada e das diluições decimais.

4. Materiais:

- 4.1. Bécker 500 mL;
- 4.2. Tubos falcon;
- 4.3. Frasco de vidro com tampa de rosca;
- 4.4. Balança;
- 4.5. Centrífuga refrigerada;
- 4.6. Água destilada;
- 4.7. Autoclave;
- 4.8. Agitador de tubos;
- 4.9. Liofilizador;
- 4.10. Peptona;
- 4.11. HCl, 1M
- 4.12. NaOH, 1M;
- 4.13. Dextrose;
- 4.14. Pipetas de 1 mL estéreis;
- 4.15. Pipetas de 10 mL ou pipetador automático;
- 4.16. Micro-ondas;
- 4.17. Phmetro;
- 4.18. Triturador de porcelana.

5. Preparo da Peptona - Fracionamento:

- 5.1. Com as silagens devidamente elaboradas e estabilizadas fracionar em centrífuga refrigerada.
- 5.2. Pesar 30g de silagem em tubos falcon devidamente tarados.
- 5.3. Centrifugar a 8.500 RPM, por 30 minutos, a 0°C.
- 5.4. Separar com auxílio de espátula e pipetador, as fases oleosa, sedimento e aquosa (de interesse) em frascos de vidro e armazenar sob congelamento (-18°C).

6. Preparo da Peptona - Liofilização:

- 6.1. A fração aquosa obtida deverá ser liofilizada em liofilizador Modelo Liotop 101.
- 6.2. Um volume de 100 ml deverá ser colocado em recipiente de vidro e acondicionado no equipamento para liofilização por um tempo de 48 horas.
- 6.3. Em seguida, o material deverá ser triturado com auxílio de um triturador de porcelana e armazenado em frascos de vidro com tampa de rosca, vedados, para evitar contato com a umidade e armazenados sob refrigeração (4 e 8°C).

7. Preparo da Peptona – Meio Cultura:

- 7.1. Pesa-se 0,5 de peptona e 0,1g de dextrose, em Bécker.
- 7.2. Dissolver com auxílio de micro-ondas, aquecendo por 2 minutos;
- 7.3. Esperar esfriar e ajustar o pH para 7, usando HCl, 1M ou NaOH, 1M.
- 7.4. Autoclavar os meios a 121°C por 15 minutos.

8. Referência:

DUMAY, J.; DONNAY-MORENO, C.; BARNATHAN, G.; JAOUEN, P.; BERGE, J.P. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2327-2332, 2006.

POERMONO, A.; BUCKLE, K.A. Crude peptone from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 333-340, 2002.

	Responsáveis	Data	Aprovação	Assinatura Gerente Qualidade
Elaboração	Ligianne Din Shirahigue	10/07/2014	Marília Oetterer	
Revisão 1	Ligianne Din Shirahigue	18/07/2014	Marília Oetterer	