



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

ROSMARIE DE OLIVEIRA GUEDES

**PRODUÇÃO DE SILAGEM BIOLÓGICA A PARTIR DE  
COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADO E  
FONTES DE CARBONO DE BAIXO CUSTO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL

**DOURADOS/MS  
MARÇO/2012**

**ROSMARIE DE OLIVEIRA GUEDES**

**PRODUÇÃO DE SILAGEM BIOLÓGICA A PARTIR DE  
COPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE PESCADO E  
FONTES DE CARBONO DE BAIXO CUSTO**

**ORIENTADOR: Profa. Dra. MÁRCIA REGINA RUSSO**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO GRACIANO FONSECA**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Ciência Ambiental.

**DOURADOS/MS  
MARÇO/2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Guedes, Rosmarie de Oliveira

Produção de silagem biológica a partir de coprodutos do processamento de pescado e fontes de carbono de baixo custo/ Rosmarie de Oliveira Guedes; orientação de Gustavo Graciano Fonseca. – Dourados, 2012.

78f.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade Federal da Grande Dourados/Faculdade de Engenharia, 2012.

1. Silagem biológica. 2. Bactéria láctica. 3. Pescado. 4. Pintado. I. Fonseca, G.G. II. Título.

CDD ou CDU

## Termo de Aprovação

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer, para a dissertação intitulada: **Produção de silagem biológica a partir de coprodutos do processamento de pescado e fontes de carbono de baixo custo**, de autoria de Rosmarie de Oliveira Guedes, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

---

Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca (Co-orientador-UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora

---

Profa. Dra. Marcia Regina Russo  
Membro Examinador (UFGD)

---

Prof. Dra. Ângela Dulce Cavenaghi Altemio  
Membro Examinador (UFGD)

---

Prof. Dr. Alessandro Minillo  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 28 de março de 2012.

*Aos meus pais Julieta de Oliveira Guedes e Julio Cezar Guedes (in memorian)  
pelos ensinamentos, pelo incentivo, e por todo amor dedicado a mim.*

Ofereço

*Deus*

*Àquele ao qual devemos toda honra e toda glória.*

*“Tudo posso Naquele que me fortalece”*

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

### Agradeço

A Deus por me dar saúde e fé para a concretização de meus objetivos;

Aos meus filhos Ricardo e Clarissa pela paciência durante a minha ausência;

Ao meu esposo, Ernesto, meu companheiro há 14 anos, por me impulsionar a sempre crescer, nunca desanimar e atingir meus objetivos;

A minha sogra Nilce Martins por todo apoio, sem ela não teria sido possível a realização desta pesquisa;

Ao meu cunhado Emilio por todo apoio técnico, e pela ótima convivência;

Ao Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela amizade, dedicação, cumplicidade, tornando possível a elaboração desse trabalho;

Aos meus colegas de convívio diário no laboratório (Bioengenharia), pelo auxílio na condução do trabalho, aos técnicos da FAEN, Priscila, Suely e Andressa e Marcos da FACET;

A minha amiga Tiara Kesli, pelo apoio científico, e moral e Janice companheira de mestrado, que muito contribuiu; aos meus amigos Roberto e Nicholas por me ajudarem na realização dos experimentos;

À Universidade Federal da Grande Dourados, por proporcionar a minha formação e espaço físico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, a oportunidade de realizar o mestrado;

À Capes, pela bolsa de estudos concedida;

Um agradecimento sincero a todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE QUADROS .....	xii
ANEXOS .....	xiii
Resumo .....	xv
Abstract .....	xvi
1 INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 Silagem de Pescado .....	19
2.2 Valor nutricional da silagem .....	22
2.3 O uso de silagem de resíduo de pescado na alimentação de peixe .....	24
2.4 Diretrizes para a sustentabilidade das indústrias de pesca .....	26
2.5 Elaboração da carne mecanicamente separada (CMS) .....	28
2.5.1 Lavagem da CMS .....	29
2.6 A espécie pintado .....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
3.1 Substratos e cossustratos .....	31
3.2 CMS de pintado .....	31
3.3 Concentrado proteico de CMS de pintado .....	32
3.4 Microrganismos .....	32
3.5 Preservação e preparo do inóculo .....	32
3.6 Meios de preservação e de pré-cultivo .....	33
3.7 Cultivos (silagem biológica) .....	33
3.8 Determinação do pH .....	34
3.9 Determinações microbiológicas .....	34
3.10 Determinações químicas (composição das silagens) .....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.1 Inóculos .....	35
4.2 Substratos .....	36
4.3 Cultivos .....	38
5 CONCLUSÃO .....	59
6 REFERÊNCIAS .....	60
ANEXOS .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMH .....	amido de milho hidrolisado
ARS .....	<i>Agricultural Research Service</i>
B .....	bactéria
BS .....	base seca
BAL .....	bactérias lácticas
CMS .....	carne mecanicamente separada
CP .....	concentrado proteico
DO <sub>600</sub> .....	densidade óptica medida a 600nm
FUN .....	fungos
Ls .....	<i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917
La .....	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431
MC .....	melaço de cana-de-açúcar
MES .....	mesófilos
MRS .....	Man Rogosa & Sharpe
MS .....	Mato Grosso do Sul
NRRL .....	Coleção de Culturas ARS (NRRL)
Oo .....	<i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472
Pa .....	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958
PCA .....	água padrão de cultura
UFC .....	unidades formadoras de colônias
USDA .....	<i>United States Drug Administration</i>
Wv .....	<i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Contagem de bactérias lácticas (BAL) em UFC/g antes da inoculação em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).....	37
<b>Figura 2.</b> Contagem de microrganismos mesófilos totais (MES) em UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L). ....	37
<b>Figura 3.</b> Contagem de fungos (FUN) em UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	38
<b>Figura 4.</b> Comparação entre as contagens de bactérias lácticas (BAL), microrganismos mesófilos totais (MES) e fungos (FUN) em UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	39
<b>Figura 5.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L). ....	39
<b>Figura 6.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	40
<b>Figura 7.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L). ...	41
<b>Figura 8.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo) em diferentes meios pasteurizados (A-L). ....	42
<b>Figura 9.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L). ....	42
<b>Figura 10.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls) em diferentes meios pasteurizados (A-L). ....	43
<b>Figura 11.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L). ....	44
<b>Figura 12.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) em diferentes meios pasteurizados (A-L). ....	44

<b>Figura 13.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	45
<b>Figura 14.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	45
<b>Figura 15.</b> Comparação entre as contagens de bactérias lácticas em UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa), <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo), <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls), <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	47
<b>Figura 16.</b> Comparação entre as contagens de microrganismos mesófilos totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa), <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo), <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls), <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	47
<b>Figura 17.</b> Superfície de resposta para o crescimento da bactéria láctica <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo) após 4 dias de cultivo em função da concentração de amido de milho hidrolisado (AMH) e carne mecanicamente separada (CMS) de pescado. Demais variáveis (melaço de cana-de-açúcar e concentrado proteico de CMS de pescado) foram fixadas em 0%.....	50
<b>Figura 18.</b> Comparação entre a umidade dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa), <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo), <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls), <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	52
<b>Figura 19.</b> Comparação entre a proteína dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa), <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo), <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls), <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	54

- Figura 20.** Comparação entre os lipídios dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L)..... 56
- Figura 21.** Comparação entre as cinzas dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L)..... 58
- Figura 22.** Comparação entre a biomassa total recuperada após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L)..... 59

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Composição dos meios de cultivo empregados.....	34
<b>Quadro 2.</b> Conteúdo de bactérias lácticas em relação ao conteúdo de microrganismos mesófilos totais em diferentes meios pasteurizados (A-L) não inoculados (S/I: sem inoculação) e após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa), <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo) ou <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls).....	49

## ANEXOS

<b>Anexo A1.</b> Contagem de bactérias lácticas (BAL) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	73
<b>Anexo A2.</b> Contagem de microrganismos mesófilos totais (MES) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	73
<b>Anexo A3.</b> Contagem de fungos (FUN) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	74
<b>Anexo A4.</b> Comparação entre as contagens de bactérias lácticas (BAL), microrganismos mesófilos totais (MES) e fungos (FUN) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	74
<b>Anexo A5.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa) em log UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L) .....	75
<b>Anexo A6.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	75
<b>Anexo A7.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo) em log UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	76
<b>Anexo A8.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo) em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	76
<b>Anexo A9.</b> Contagem de bactérias lácticas <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls) em (A) (UFC/g) e (B) (log UFC/g) após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	77
<b>Anexo A10.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	77
<b>Anexo A11.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	78

<b>Anexo A12.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em (A) (UFC/g) e (B) (log UFC/g) após 4 dias de cultivo com <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	78
<b>Anexo A13.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	79
<b>Anexo A14.</b> Contagem de microrganismos aeróbios totais em (log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	79
<b>Anexo A15.</b> Comparação entre as contagens de bactérias lácticas em log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa), <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo), <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls), <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L). .....	80
<b>Anexo A16.</b> Comparação entre as contagens de microrganismos mesófilos totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-14958 (Pa), <i>Oneococcus oeni</i> NRRL B-3472 (Oo), <i>Lactobacillus sakei</i> NRRL B-1917 (Ls), <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 (Wv) ou <i>Lactobacillus acidophilus</i> NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).....	80
<b>Anexo B1.</b> Meios de cultivo antes da inoculação .....	81
<b>Anexo B2.</b> Meios de cultivo após 4 dias da inoculação com <i>Weissella viridescens</i> NRRL B-1951 .....	81

## Resumo

Os resíduos e coprodutos provenientes da industrialização de pescado representam vasta fonte de energia e de nutrientes, que podem ser convertidos em ingredientes para aquicultura e, em geral, para alimentação animal. Uma alternativa de grande potencial é o seu aproveitamento na elaboração de silagem, produto liquefeito pela ação microbiana e de alto valor biológico. O aproveitamento das proteínas da silagem pelos animais depende da sua digestibilidade e composição de aminoácidos, que pode ser diferente, dependendo do tipo de microrganismos utilizado na produção da silagem. Este trabalho objetivou a produção de silagem biológica a partir de carne mecanicamente separada (CMS) e concentrado proteico do CMS ambos de pintado (*Pseudoplatystoma* spp.), o qual foi, acrescida de amido de milho hidrolisado ou melaço de cana-de-açúcar como cossubstrato, nas concentrações de 0, 10 ou 20%, utilizando-se as bactérias ácido-lácticas *Oneococcus oeni* NRRL B-3472, *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 , *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958, *Weissella viridensis* NRRL B-1951 , *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431. Cultivos foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer a 30°C durante 4 dias. Os resultados indicam que a silagem obtida com *P. acidilactici* em CMS de pescado sem a adição de fonte de carbono apresenta maior potencial para uso como ração devido à alta concentração destas bactérias no meio e sua prevalência sobre as bactérias mesófilas deteriorantes. Houve diferenças no metabolismo das diferentes bactérias estudadas em relação aos diferentes substratos disponibilizados.

**Palavras-chave:** Silagem; bactéria láctica; pescado; pintado.

## Abstract

The co-products and waste from the manufacturing of large fish represent energy source and nutrients can be converted to ingredients for aquaculture and in general feed. An alternative is great potential for its use in the preparation of silage, liquefied product by microbial action and high biological value. The use of silage protein depends on the animal by its digestibility and amino acid composition, which may be different, depending on the microorganisms used in the production of silage. This study aimed to produce biological silage from mechanically deboned meat (CMS) and protein concentrate CMS painted (*Pseudoplatystoma* spp.), Plus corn starch hydrolyzate or molasses cane sugar as cossustrato at concentrations of 0, 10 or 20%, using lactic acid bacteria *Oneococcus oeni* NRRL B-3472, *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958, and *Weissella viridensis* NRRL B- 1951, and *Lactobacillus acidophilus*and NRRL B-23431. Cultivations were carried out in Erlenmeyer flasks at 30 ° C for 4 days. The results obtained indicate that the silage with *P. acidilactici* in CMS fish without the addition of carbon source is more suitable for use as food because of the high concentration of these bacteria in the environment and their prevalence on the mesophilic spoilage. The biological silage adds protein quality. There were differences in the metabolism of different bacteria in relation to different substrates available.

**Keywords:** Silage; Lactic bacteria; Fish, Pintado.

## 1 INTRODUÇÃO

Dependendo da espécie e de seu uso final, até 75% do pescado é desperdiçado durante o processamento da porção destinada ao consumo humano (Arvanitoyannis e Kassaveti, 2007). Na filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), e.g. cerca de 66% da matéria-prima é descartada (Boscolo *et al.*, 2004). A produção de pescado é uma excelente alternativa para incrementar os índices de consumo de proteínas de origem animal e um importante fator de desenvolvimento sócio-econômico para o país (Macedo-Viegas; Souza, 2004). Além disso, à medida que ocorre o declínio nos estoques de espécies tradicionais de pescado de origem marítima há o aumento da demanda mundial de proteínas de origem animal. Porém, isto tudo tem contribuído com o desenvolvimento de técnicas para o melhor aproveitamento dos resíduos, subprodutos e coprodutos gerados no processamento de recursos pesqueiros (Rustad, 2003).

Não há uma definição sobre quais constituintes se enquadram em cada categoria. Os resíduos gerados durante o processamento do pescado são sólidos arrastados na água de tratamento durante a manipulação do pescado ou sólidos solúveis dispersos na água de processamento (Tejada, 1992). Vísceras, cabeça, aparas, ossos e pele são considerados como subprodutos da indústria de pescado. As regulamentações geralmente dividem entre subprodutos que podem ser destinados para consumo humano e descarte (Rustad, 2003). A carne mecanicamente separada (CMS) de pescado é um coproduto obtido através de máquinas desossadoras (ou despoldadeiras) de pescado para recuperar o máximo possível de carne deixada na carcaça após o processamento da filetagem ou para utilizar espécies de baixo valor comercial que não podem ser industrializadas devido ao seu tamanho e forma (Morais, 1994). O concentrado proteico, por sua vez, é um coproduto que reúne o conjunto de proteínas miofibrilares da matéria-prima cárnea, obtidas a partir de sucessivas lavagens, as quais removem sangue, pigmentos, proteínas sarcoplasmáticas, componentes solúveis, lipídios e outras substâncias que pode catalisar a degradação proteica (Lee, 1984; Gonçalves *et al.*, 2007).

Do ponto de vista da composição, esses compostos são constituídos por proteínas de funções e origens diferentes, lipídeos, nitrogênio não-protéico,

carboidratos, substâncias minerais, entre outros; com uma proporção diferente de cada um deles em função de onde provém (Contreras, 1994).

Os coprodutos do processamento de pescado são uma excelente matéria-prima para preparação de alimentos de alto valor protéico (Gómez-Guillén *et al.*, 2002). Com o seu aproveitamento alternativo é possível reduzir o custo das matérias-primas aumentando a produtividade das indústrias e minimizando problemas de poluição ambiental (Arvanitoyannis e Kassaveti, 2007). Assim, a necessidade de se montar sistemas para aproveitamento de coprodutos industriais é de ordem econômica e de conservação de energia, possibilitando um uso mais racional da matéria-prima e o desenvolvimento de novos produtos (Oetterer, 1994; Espíndola Filho, 1997).

O valor nutricional de um alimento não deve ser somente baseado na sua composição química, mas também na quantidade de nutrientes ou energia que pode disponibilizar (Furuya, 2000). Através da valoração da matéria-prima de origem animal perdida durante o processamento, uma vasta fonte de energia e de nutrientes pode ser convertida em ingredientes para a indústria de alimentação animal. Uma alternativa de grande potencial está na elaboração do ensilado de pescado, produto de alto valor biológico (Honczaryck e Maeda, 1998; Parin e Zugarramurdi, 1994; Vidotti *et al.*, 2002). Esta é uma técnica antiga de preservação da matéria orgânica (Hammoumi *et al.*, 1998; Shirai *et al.*, 2001), simples, prática, cujo equipamento essencial é de baixo custo e a escala de produção é variável, sendo muito conveniente ecológica e financeiramente (Disney *et al.*, 1977; Jackson *et al.*, 1984a,b; Ottati, 1990; Tatterson e Windsor, 1974).

A silagem de pescado se constitui em um produto líquido ou semilíquido, produzido a partir do pescado inteiro ou partes dele, preservado pela adição de ácidos ou bases (silagem química) ou por fermentação microbiana induzida por carboidratos (silagem biológica) (Kompiang, 1981; Costa *et al.*, 2002; Crexi, 2005). Neste processo as proteínas são hidrolisadas pelas enzimas naturalmente presentes e/ou adicionadas (silagem enzimática), originando um produto rico em proteínas, peptídeos de cadeia curta e aminoácidos livres (Stone e Hardy, 1986; Valério, 1994).

O grau de hidrólise pode ser usado como critério químico para avaliar a qualidade da silagem de pescado (Espe *et al.*, 1989; Espe e Lied, 1999).

Segundo [Stone et al. \(1989\)](#), o valor nutricional da silagem pode ser significativamente aumentado, limitando a hidrólise das proteínas e polipeptídeos em aminoácidos livres.

Vários autores vêm ressaltando o alto coeficiente de digestibilidade da silagem de pescado em experimentos com diversas espécies de peixes, mostrando a viabilidade econômica do uso dessa fonte, além do benefício ambiental ([Fagbenro, 1994](#); [Fagbenro e Jauncey, 1995a, 1995b](#); [Goddard e Al-Yahyai, 2001](#); [Vidotti et al., 2002](#)), que é devida ao fato da proteína já está bastante hidrolisada e da presença de lisina e triptofano entre outros aminoácidos essenciais refletindo-se sobre o ganho de peso e conversão alimentar dos animais ([Hall, 1985](#)).

A Noruega é o maior produtor mundial de silagem, produzindo cerca de 140.000 toneladas/ano, principalmente a partir de subprodutos da aquicultura ([Rustad, 2003](#)). No Brasil o processo de silagem ainda não é empregado industrialmente, embora estudos venham sendo desenvolvidos a partir dos resíduos do processamento de pescado ([Costa et al., 2002](#)).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de silagem biológica obtida a partir de coprodutos do processamento de pescado (CMS e concentrado proteico de CMS de pintado) e fontes de carbono de baixo custo (amido de milho hidrolisado e melão de cana-de-açúcar).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Silagem de Pescado**

A ensilagem de resíduos de pescado é uma técnica antiga de preservação da matéria orgânica ([Hammoumi et al., 1998](#)). A metodologia para preservação do resíduo de pescado foi adaptada por Edin na década de 30, a partir de um método patenteado por Virtanen na década de 20, que utilizava os ácidos sulfúrico e clorídrico para preservação de forragens ([Raa e Gilberg, 1982](#)).

Desde a década de 40, a silagem tem sido produzida em muitos países, como Canadá, Inglaterra, Noruega e Alemanha, mas foi, preferencialmente, na Dinamarca, Polônia e Noruega que o processamento da silagem prosseguiu em escala comercial ([Sales, 1995](#)).

Duas metodologias básicas podem ser utilizadas na obtenção de ensilado de pescado: através da adição de ácidos minerais ou orgânicos tais como, fórmico, sulfúrico, clorídrico, propiônico, etc. (Wignall e Tatterson, 1977; Disney e James, 1979; Lupín, 1983; Windsor e Barlow, 1984; Rodriguez et al., 1989) ou com o emprego de microorganismos produtores de ácido láctico e ainda uma fonte de carboidratos. Este produto elaborado com diferentes resíduos de pescados, fontes de carboidratos e microorganismos produtores de ácido láctico (Lindgren e Pleje, 1983; Van Wyk e Heydenrych, 1985; Ottati e Bello, 1989; Lessi et al., 1989).

Segundo Lupín (1983) o processo de ensilagem de pescado, conhecido há muito tempo, consiste basicamente em acidificar o pH da massa de pescado triturada, deixando livre para a ação das enzimas próprias dos tecidos, que terminam liquefazendo o mesmo.

O ensilado convencional apresenta pH entre 3,9 e 4,2, que em três dias, a uma temperatura ambiente de 27 a 300 C, se liquefaz suficientemente, restabelecendo a camada de lipídeos e conservando a atividade enzimática por muitos meses (Backhoff, 1976).

O uso do ácido fórmico em mistura com os ácidos sulfúrico e clorídrico, promove o abaixamento do pH a níveis entre 4,0 e 4,5, enquanto que a utilização de ácidos minerais sozinhos abaixam o pH em torno de 2,0, necessitando, de uma neutralização posterior à hidrólise, (Wignall e Tatterson, 1977). Porém, segundo Oetterer (1994), essa mistura com os ácidos clorídrico e sulfúrico tem a vantagem de apresentar baixo custo.

Na elaboração de seis fórmulas de ensilado com diferentes tipos de pescado Tatterson e Windsor (1974) utilizaram 3,0% de ácido fórmico a 98% e obtiveram valores de pH em torno de 4,0 em todos os produtos e teores de proteína próximos de 14%, de gordura variando de 0,5 a 16,3% e os de minerais ao redor de 2,5%.

O processo de ensilagem apresenta muitas vantagens sobre a produção da farinha de peixe, pois a tecnologia é relativamente simples, o equipamento essencial é de baixo custo e a escala de produção é variável. O produto final é estável, apresenta-se com consistência semi-líquida e possui bom valor nutricional, podendo ser usado como ingrediente em rações animais

(Coello et al., 2000; Espíndola Filho, 1999; Jackson et al., 1984a; Martin e Bemister, 1994; Oetterer, 1994; Ottati, 1990; Tatterson e Windsor, 1974).

A fermentação microbiana pode ocorrer no pescado, desde que haja uma fonte de carboidratos adicionada à biomassa. Assim, as bactérias produtoras de ácido láctico propiciarão a preservação através da produção de ácido láctico e conseqüente abaixamento do pH (Oetterer, 1994), inibindo o crescimento de bactérias como *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrosacter*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* (Dapkevicius et al., 2000; Samuels et al., 1991; Wyk e Hydenryck, 1985). Além da acidez, acredita-se que a habilidade de certas bactérias ácido lácticas em produzir compostos antibacterianos, chamados bacteriocinas, colaboram na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos (Borrensen, 1990; Lindgren e Pleje, 1983). Zahar et al. (2002), estudaram o efeito da temperatura, anaerobiose e agitação da massa, na produção de silagens biológicas, utilizando como fonte de carboidrato o melaço de cana. Os autores concluíram que a fermentação natural é acelerada, se conduzida em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), recipientes fechados e com agitação diária da massa.

Foram preparadas por Vidotti et al. (2003), silagens biológicas e ácidas, a partir de diferentes matérias-primas. Os autores concluíram que além de serem viáveis, os processos utilizados para a preservação do resíduo de pescado, mantêm a qualidade protéica dos produtos.

Valério (1994) elaborou silagens enzimáticas a partir do resíduo do processamento de sardinhas, como alternativa ao processo tradicional, e concluiu que o uso das enzimas protease e pepsina, produziram silagens com composição semelhante à da matéria-prima.

Berenz (1994) preparou silagens biológicas utilizando 5% de iogurte e 10% de melaço de cana, obtendo um produto com 63,32% de umidade e 18,46% de proteína bruta (base úmida). O autor testou o produto obtido na alimentação de frangos de corte e concluiu que a silagem é uma fonte protéico-energética, possível de ser utilizada em rações, sem perda do desempenho e da qualidade da carcaça.

De acordo com vários autores (Goddard e Al-Yahyai, 2001; Kompiang, 1981; Morales-Ulloa, 1994; Morales-Ulloa e Oetterer, 1995, 1997; Valério, 1994), a silagem produzida com uma mistura de ácidos fórmico e propiônico,

na proporção de 1:1 e adição de 1,5 a 3,0% (v/p) em relação à massa é recomendada, e o produto obtido é estável e livre de microrganismos patogênicos.

## 2.2 Valor Nutricional da Silagem

Apesar das alterações nas estruturas físicas e químicas do peixe, o valor nutricional da silagem é semelhante ao material que lhe deu origem, variando, consideravelmente, com o tipo de matéria-prima empregada, particularmente quanto ao teor de lipídios (Disney et al., 1977; Haard et al., 1985; Kompang 1981).

Durante o armazenamento prolongado, grande número de aminoácidos livres está presente na silagem devido a atividade das enzimas endógenas. A hidrólise prolongada, no entanto, pode resultar numa redução do valor nutricional da silagem (Viana et al., 1999). Para evitar a hidrólise excessiva durante estocagem prolongada, as enzimas presentes no pescado podem ser inativadas pelo aquecimento da matéria-prima por 5 minutos, a 60°C, antes da ensilagem, resultando na redução de 15% no nível de aminoácidos livres, após 90 dias, quando comparada com uma silagem que não foi aquecida (Viana et al., 1996).

De acordo com Oetterer (1999) e Raa e Njaa (1989), o valor nutricional da silagem está na digestibilidade protéica elevada, que deve ser preservada evitando-se estocagem prolongada e, portanto, hidrólise excessiva.

Vários autores (Goddard e Al-Yahyai, 2001; Stone et al., 1989; Stone e Hardy, 1986; Viana et al., 1996, 1999), citam que limitando-se a hidrólise protéica, o valor nutricional do produto final do processo de ensilagem é superior, quando comparado a um material excessivamente hidrolisado, já que os peptídeos de cadeia curta são melhor absorvidos que os aminoácidos livres.

Segundo Espe et al. (1989), uma explicação provável para a redução do valor nutricional, pode ser o fato dos aminoácidos livres serem rapidamente desviados da síntese protéica e entrarem na rota catabólica. Os mesmos autores citam que os aminoácidos livres estão mais disponíveis para serem utilizados como fonte de energia do que as proteínas intactas.

Os aminoácidos livres, em presença de hidroxilas provenientes do açúcar, entram na reação de Maillard, resultando em diminuição do valor

nutricional da silagem (Fagbenro, 1994; Fagbenro e Jauncey, 1998; Johnson et al., 1985).

De acordo com Stone e Hardy (1986), altos níveis de aminoácidos livres na dieta interferem no mecanismo de absorção de aminoácidos e peptídeos de cadeia curta.

Os peptídeos de cadeia curta quando absorvidos reduzem as flutuações no nível de aminoácidos no plasma e retornam disponíveis para a síntese protéica por períodos mais longos do que os aminoácidos livres.

Outro fator importante na deterioração da qualidade das silagens armazenadas por longos períodos é o processo de oxidação lipídica, resultando em alterações de sabor, cor, textura, valor nutricional e produção de componentes tóxicos (Sales, 1995).

Kompiang (1981) destaca que a eficiência de conversão se torna baixa e o valor nutricional é também afetado, negativamente, com o aumento do tempo de armazenamento. Para o autor há uma relação direta do escurecimento provocado por reações dos lipídios com a perda do valor nutritivo.

Disney et al. (1977), citam que as mudanças que ocorrem com os lipídios durante o armazenamento da silagem são o aumento do conteúdo de ácidos graxos livres, indicando hidrólise de glicerídeos e alterações oxidativas que levam ao escurecimento. Sales (1995), relata que quando as proteínas são expostas a lipídios peroxidados, uma considerável porção destes complexa-se com proteínas através de associações e/ou ligações de hidrogênio, causando perda do valor nutritivo.

A oxidação de lipídios pode causar a formação de peróxidos, que podem complexar as proteínas, através de ligações físicas e covalentes (Nelson e Cox, 2000). Ligações covalentes entre produtos oxidados e proteínas podem destruir aminoácidos como triptofano, oxidar a metionina e ligar a lisina a outros compostos tornando estes aminoácidos indisponíveis (Nelson e Cox, 2000).

Tocher et al. (1997), demonstraram que silagens preparadas utilizando tecidos que compõem o sistema nervoso de peixes são ricos em fosfolipídios e triglicerídeos dependendo da espécie e do tecido (olho, cérebro). Todos continham altos níveis de docosahexaenóico e alta proporção de docosahexaenóico : eicosapentaenóico. De acordo com Sales (1995) e Dapkevicius et al. (2000), a formação de aminas biogênicas pode também ser

um problema, se a silagem de pescado for produzida a partir de uma matéria-prima alterada com altos níveis de aminoácidos livres.

[Espíndola Filho et al. \(1998\)](#) procederam ao processamento de silagem de resíduos de peixes, camarões e bivalves, e obtiveram um concentrado protéico-mineral para ser utilizado em rações animais, contendo 10% de umidade, 50% de proteína, 8% de lipídios e 20% de cinza, sendo desta, 5% de cálcio, 2% de fósforo e outros minerais em menores proporções.

### **2.3 O uso de silagem de resíduo de pescado na alimentação de peixe**

Segundo [Lupín \(1983\)](#) o ensilado de pescado pode ser utilizado na piscicultura de água doce como alimento de peixes, diminuindo os custos de produção.

A silagem de pescado vem sendo produzida na Polônia e na Dinamarca em escala comercial desde os anos 60, para produção de alimentos para aves e suínos, ou incorporada à rações como complemento protéico, compondo alimento para animais domésticos e peixes provenientes de aquicultura. Na Indonésia, a silagem é produzida em escala experimental e incorporada às rações em substituição a farinha de peixe e o farelo de soja na alimentação de suínos, peixes e aves ([Oetterer, 1994](#)).

Silagens ácidas produzidas a partir de peixes inteiros ou resíduo do processamento de peixes foram testadas em dietas de trutas ([Stone et al, 1989](#)) concluindo que são fontes equivalentes de nitrogênio protéico, desde que o grau de hidrólise seja o mesmo e as dietas sejam balanceadas nutricionalmente.

Estudos feitos por [Cisse et al. \(1995\)](#) demonstraram que a boa aceitabilidade da silagem de peixe como um ingrediente em rações para bagre africano, constitui uma alternativa econômica ao uso da farinha de peixe, utilizando-se basicamente sobras de peixes marinhos ou peixes de baixo valor comercial.

[Ximenes Carneiro \(1991\)](#) alimentou alevinos de tambaqui, com ração à base de ensilado biológico e concluiu que, devido a sua ótima aceitabilidade pelos peixes, apresenta um grande potencial como substituto da farinha de carne e ossos ou da farinha de peixe. A composição corporal desses peixes

alimentados com ração à base de ensilado apresentou maiores teores de cálcio e fósforo.

Experimentos mostraram que silagem de arenque foi bem digerida e que o crescimento do salmão do Atlântico não foi afetado significativamente quando alimentado por um longo período com este produto (Lall, 1991).

Estudos comparando silagem ácida de resíduos de “dog-fish” com a de arenque na produção de salmão, mostraram que esta foi aceitável desde que em condições próprias de estocagem. Isto tornaria possível a utilização eficiente de uma fonte protéica inadequada ao consumo humano, convertendo-a em um produto alimentar humano de alta qualidade e também uma solução para problemas ambientais (Heras et al. 1994).

Affandi (1986) concluiu que a incorporação da silagem de peixe na ração de enguias, proporcionou melhoria da palatabilidade, e aumento na ingestão levando conseqüentemente a um maior desempenho no crescimento. A produção de silagem com material apropriado e econômico pode ser uma solução parcial para o uso de subprodutos e reduzir, desta forma, o custo de cultivo de enguia.

Alevinos de enguia alimentados com dietas isocalóricas e isoprotéicas contendo diferentes percentagens de inclusão de silagem de peixe (10, 15 e 20%) apresentaram melhores resultados de desempenho quando comparados com os submetidos à dieta controle na qual a farinha de carne e peixe eram as únicas fontes protéicas. Os autores atribuíram essa melhora ao aumento da ingestão devido a possível presença de atrativos alimentares (Gonçalves et al. 1989).

Fagbenro et al. (1994) alimentaram juvenis de bagre africano e tilápia com dietas contendo silagem de tilápia fermentada e co-seca e concluíram que foi adequada como suplemento protéico para dietas de peixes, representando um método alternativo barato e saudável do ponto de vista ambiental, pois utiliza sobras de peixe de muitas comunidades pesqueiras e de indústrias de processamento de peixes.

Ramos et al. (1994) relataram que o pescado fresco preservado em ácidos, pode ser uma boa fonte de proteína e que o seu valor nutricional quando incluído em dietas para tambaqui, em uma proporção de 13% em base úmida e misturado com cereais, foi comparável com a farinha de pescado.

Fagbenro e Bello-Olusoji (1997) consideraram que os coeficientes de digestibilidade aparente são parâmetros importantes a serem considerados na formulação de dietas e determinantes na utilização de um alimento, demonstrando que a silagem fermentada de cabeça de camarão, apresenta-se como uma boa alternativa de ingrediente protéico em dietas para o bagre africano.

Na procura por alimentos de alta qualidade nutricional, uma alternativa seria o processamento dos subprodutos gerados pela própria atividade aquícola. A silagem de peixe é uma forma de seu aproveitamento, sendo um processo simples que não envolve maquinarias específicas ou grandes gastos com materiais de consumo.

#### **2.4 Diretrizes para a sustentabilidade das indústrias de pesca**

A sobrevivência da indústria de pesca no mercado, em longo prazo, pode depender da sua capacidade para responder de imediato às exigências presentes e determinar as exigências futuras do consumidor. Além do desenvolvimento de novos tipos de produtos para atender a demandas de consumo é preciso estar atento para as novas atitudes de consumo, como por exemplo, o crescente interesse por alimentos saudáveis, com alto valor nutritivo e de fácil preparo (Peixoto, 2000).

De acordo com Rivera (1994), os oceanos proporcionam uma grande quantidade de recursos marinhos, os quais se fossem aproveitados na sua máxima potencialidade, proporcionariam excelentes fontes nutritivas para o consumo humano. Entretanto, existe uma grande diferença entre os recursos marinhos conhecidos como alimento e aqueles que se perdem. Assim, o grande desafio para a tecnologia pesqueira será a transformação de espécies de baixo valor comercial e de resíduos em alimentos.

Grande parte do pescado produzido e que acaba se transformando em resíduo no tratamento industrial, pode ser utilizada para a produção de alimentos nutritivos e de baixo custo, sendo uma alternativa viável de exploração comercial, e que vai ao encontro de diretrizes ambientais, diminuindo, muitas vezes, a disposição dessas fontes de poluição orgânica no meio ambiente. Miranda (1997) também ressalta que a sobrevivência a longo prazo da indústria de pesca no mercado pode depender da sua capacidade em

responder de imediato e determinar os requerimentos presentes e futuros do consumidor, e do desenvolvimento de novos tipos de produtos que vão ao encontro não só das demandas de consumo, mas também às novas atitudes de consumo. [Stori \(2000\)](#) descreve que o processo de beneficiamento de pescados, podem nos oferecer muito mais do que alimento de alto valor nutricional; fornece-nos também uma grande quantidade e variedade de material rejeitado que acaba se perdendo, provavelmente devido a falta de interesse e conhecimento do setor pesqueiro e de órgãos governamentais sobre procedimentos tecnológicos para um melhor aproveitamento destes materiais. O autor também destaca o fato de que a redução de resíduos é um processo que depende de várias condições, como: pesquisa e desenvolvimento de tecnologias limpas, adequação e modernização das indústrias, abertura de mercados, políticas de fomento e crédito, esforços gerenciais coordenados, entre outros. Estas condições nem sempre são facilmente satisfeitas, principalmente em países em desenvolvimento, resultando em descrédito ao setor empresarial.

Há uma grande diferença entre países desenvolvidos e em desenvolvimento quanto a utilização dos resíduos. Enquanto países desenvolvidos e em desenvolvimento estão aplicando programas para a valorização e minimização dos resíduos há vários anos atendendo a exigência deste tipo de trabalho a longo prazo, países em desenvolvimento estão sendo forçados a sacrificar o desenvolvimento e a produção devido a falta de conhecimento sobre o potencial dos resíduos e a possibilidade de caminhar para o desenvolvimento sustentável maximizando a utilização das matérias primas, associado a novos conceitos sobre processos objetivando a minimização dos resíduos.

Segundo [Lerípio et al. \(1997b, apud STORI, 2000.\)](#) a poluição industrial é, na verdade, uma forma de desperdício e ineficiência dos processos produtivos.

Resíduos industriais representam, na maior parte dos casos, perdas de matérias primas e insumos. Desta maneira, o princípio de gerenciamento conhecido como Ecologia Industrial passa a ser o novo paradigma da produção industrial, como o caminho para a sustentabilidade. Na Ecologia Industrial cada companhia tem uma função na cadeia de transferência de material, consumo,

uso final e recuperação, exatamente como ocorre com um organismo qualquer dentro de um ecossistema.

A Ecologia Industrial pressupõe uma sustentabilidade obrigatória, a qual requer uma mudança de paradigma na indústria e no comércio. Dentro deste enfoque, a ONU, através da Universidade das Nações Unidas, lançou em 1995 o programa de Iniciativa para a Pesquisa em Emissão Zero (ZERI- *Zero Emission Research Initiative*), que consiste na formulação de uma proposta de direcionamento da visão empresarial e científica para a questão da sustentabilidade. O programa ZERI propõe a formação de núcleos de estudos em determinadas linhas básicas, escolhidas a partir das potencialidades dos países participantes da primeira de suas fases. A Universidade das Nações Unidas se dispõe a aglutinar diversas linhas de pesquisa que abordam a sustentabilidade, coordenando suas ações na busca e sugestão de tecnologias para empresas ou grupo de empresas que apresentem algum tipo de desperdício no processo industrial.

[Dalsenter \(1999\)](#) também destaca a proposta Zeri como uma alternativa viável para se alcançar a plena sustentabilidade, sendo necessária uma mudança na forma de agir e de pensar, através da promoção de pesquisas e desenvolvimentos que lançam uma revolução na produtividade para enfrentar o desafio econômico, industrial e social do século XXI, transformando o meio em que vivemos. O caminho é alcançar uma produtividade sustentável: zero emissão, zero resíduo e completo uso de materiais não trabalhados ou brutos.

## **2.5 Elaboração da carne mecanicamente separada (CMS)**

O consumo de peixes no Brasil ainda é baixo, em torno de 6 kg/hab./ano. Uma das maneiras de se reverter este quadro seria o uso de mecanismos que estimulem as diferentes formas de apresentação do pescado, uma vez que o consumidor busca alimentos de fácil e rápido preparo ([Oetterer et al., 2004](#); [Souza et al., 2004](#)).

De acordo com [Tenuta-Filho e Jesus \(2003\)](#) a carne mecanicamente separada (CMS) de pescado é um produto obtido a partir de uma única espécie, ou mistura de espécies de peixes com características sensoriais similares, através do processo de separação mecanizada da parte comestível, gerando partículas de músculo esquelético isenta de vísceras, escamas, ossos

e pele. Os resíduos de filetagem, peixes em diferentes estágios de crescimento e espécies sub-utilizadas podem ser utilizados para a produção da CMS. Segundo [Morais e Martins \(1981\)](#) a aplicação do processo de extração da CMS destaca-se como um processo atraente pela possibilidade de maior recuperação de carne em relação à obtida pelos métodos tradicionais de filetagem diminuindo o custo de produção e a quantidade de resíduo gerada e, além disso, permite a maior possibilidade de diversificação de produtos da indústria pesqueira.

A maioria das máquinas usadas para separação do músculo do pescado tem como unidade básica um tambor perfurado. O sistema operacional mais comum, conhecido como *belt-and-drum*, consiste de uma cinta giratória e de um tambor. O peixe decapitado e eviscerado passa entre a cinta e o tambor, sendo o músculo comprimido para o interior deste último através dos orifícios, cujos diâmetros podem variar de 1 a 7 mm ([Tenuta-Filho; Jesus, 2003](#)), porém o mais utilizado apresenta orifícios de 5 mm de diâmetro ([Ordóñez et al., 2005](#)). No entanto, já existem no mercado, equipamentos cujo sistema é de rosca sem fim, que pressionam o músculo através de um conjunto de discos perfurados que contêm lâminas em seu interior.

O processo de obtenção da CMS causa o rompimento da integridade muscular do pescado, permitindo um contato próximo entre os compostos celulares com o oxigênio do ar ([Rodríguez-Herrera et al., 2006](#)), favorecendo a oxidação lipídica, o que afeta a coloração, sabor e textura da CMS, tornando-a mais propensa à rancidez oxidativa e, portanto, sujeita à menor aceitação pelo consumidor ([Benjakul et al., 2005](#); [Munasinghe et al., 2005](#)).

O processo de desossa mecânica da carne do pescado pode promover a incorporação de microrganismos, se estes estiverem presentes na matéria-prima. As dilacerações dos tecidos expõem componentes celulares como aminoácidos e vitaminas, tornando a CMS um excelente meio para desenvolvimento de microrganismos e, portanto, um produto altamente deteriorável ([Raccach; Baker, 1978](#); [Simões et al., 1998](#)).

### **2.5.1 Lavagem da CMS**

O processo de lavagem da CMS proporciona a remoção de pigmentos, proteínas solúveis, enzimas, parte dos lipídeos e componentes flavorizantes,

aumentando a estabilidade e melhorando a cor e o odor (Adu et al., 1983; Lanier, 1986; Park; Lin, 2005), apesar de causar mudanças nas características físico-químicas da CMS. O volume da água de lavagem, o tempo de contato entre músculo e água, e o número de ciclos de lavagens, a serem usados, dependerão do tipo e preparo da matéria-prima e do nível de remoção necessário para atender aos requisitos de qualidade do produto final (Park; Lin, 2005). Em geral, uma relação de 3:1 ou 4:1 e três ciclos de lavagem, de 10 minutos cada, são adequados para a maioria das aplicações (Lee, 1986; Tenuta-Filho; Jesus, 2003; Park; Lin, 2005). A temperatura de refrigeração da água recomendada é igual ou abaixo de 10°C, para manter as propriedades funcionais das proteínas do tecido do peixe (Oetterer et al., 2004).

Segundo Willes et al., (2004) o conteúdo de lipídeos tende a diminuir após a lavagem, pois os lipídeos que flutuam na superfície do líquido são removidos, bem como a perda de proteína pela lixiviação, a qual pode variar 15 a 30% do total protéico da carne (Huidobro et al., 1998).

## 2.6 A espécie pintado

O pintado, *Pseudoplatystoma coruscans*, é uma espécie da família Pimelodidae, encontrado frequentemente nas Bacias dos Rios Paraguai-Uruguaí e São Francisco. Apresenta ótima aceitação de mercado, devido à excelente palatabilidade e ausência de espinhos intramusculares em sua carne, além de poder atingir em um ano, peso duas vezes maior que o das espécies produzidas atualmente (Gonçalves e Carneiro, 2003).

A reprodução de peixes do gênero *Pseudoplatystoma* vem sendo pesquisada desde o início da década de oitenta, mas só atingiu escala comercial no início da década de noventa. Apesar da tecnologia atual para a obtenção de alevinos, o maior desafio está sendo a sua alimentação em cativeiro, devido ao alto custo, pelo seu hábito alimentar piscívoro, e principalmente, à falta de conhecimento de suas exigências nutricionais e digestibilidade dos alimentos utilizados na sua dieta, que levariam à maximização do aproveitamento dos nutrientes.

Em estudos de nutrição, os coeficientes de digestibilidade aparente são geralmente utilizados com o objetivo de determinar o valor nutricional de um alimento (Rodrigues, 1994). De acordo com McGoogan e Reigh (1996), a

digestibilidade do ingrediente de um alimento depende, primeiramente, da composição química e também da capacidade digestiva do animal para o alimento. Ela é de extrema importância para o atendimento das exigências nutricionais de uma espécie, uma vez que o conhecimento dos hábitos alimentares e o fornecimento de uma dieta equilibrada não são suficientes para assegurar resposta positiva no desempenho do animal (Souza, 1989).

Na atualidade, estão sendo exigidas maiores investigações acerca das exigências nutricionais de cada espécie, além de rigorosa formulação da dieta Albernaz, (2000). Sem os dados de digestibilidade dos nutrientes, os nutricionistas, arriscam-se em super-dosagens, principalmente de proteína bruta que elevam à sua ineficácia e ao alto custo de produção, ou em subdosagens, que podem reduzir as taxas de crescimento e, de outras formas, o desempenho dos peixes.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Substratos e cossustratos**

Os substratos utilizados para a elaboração das silagens foram carne mecanicamente separada (CMS) e concentrado proteico de CMS de pescado pintado (*Pseudoplatystoma* spp.). A CMS de pintado foi gentilmente fornecida pela indústria Mar & Terra de Pescados S.A., localizada no município de Itaporã, MS. O concentrado proteico de CMS de pintado foi produzido conforme item 2.3. Ambos foram preservados a -18°C. Os cossustratos utilizados foram amido de milho hidrolisado (AMH) (Karo), adquirido do comércio local e melaço de cana-de-açúcar (MC), gentilmente cedido pela Usina São Fernando de Açúcar e Álcool, localizada no município de Laguna Carapã, MS. O AMH foi mantido a 4°C e o MC a -18°C. Todos os substratos e os cossustratos foram armazenados por no máximo 3 meses após o recebimento ou preparo.

#### **3.2 CMS de pintado**

Foi produzida a partir dos subprodutos da filetagem do pintado no diâmetro de partícula de 3 mm, utilizando-se uma despoldadeira modelo 694 (Baader, Alemanha), operando a 6°C na entrada e 10°C na saída, 24h após o abate.

### 3.3 Concentrado proteico de CMS de pintado

Foi realizada a partir dos métodos por lavagem em pH alcalino e peneiração, utilizando bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 0,25% e cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) a 0,3%. Nesse processo utilizou-se a proporção 1:4 (sólido:líquido) de amostra para solução de lavagem. Homogeneizou-se a solução manualmente durante cinco minutos abaixo de  $10^\circ\text{C}$ , e em seguida retirou-se a gordura e peneirou-se a solução obtendo-se uma pasta. Para cada processo fez-se três repetições, correspondentes às lavagens, sendo que para as duas primeiras utilizou-se soluções de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 0,25%, e na última com solução de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) a 0,3%.

### 3.4 Microrganismos

Foram utilizadas as bactérias ácido-lácticas *Oneococcus oeni* NRRL B-3472, *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917, *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958, *Weissella viridescens* NRRL B-1951, *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 gentilmente cedidas por James Swezey, da Coleção de Culturas ARS (NRRL), do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA).

### 3.5 Preservação e preparo do inóculo

As linhagens foram recebidas na forma liofilizada, cultivadas em caldo MRS (Man Rogosa & Sharpe) até o fim da fase exponencial (reativação), e adicionadas de glicerol a uma concentração final de 15% (p/v), divididas em alíquotas de 1 ml desta cultura e estocadas em tubos criogênicos (2 ml) a  $-18^\circ\text{C}$ . Para o preparo dos experimentos, uma alíquota-estoque foi utilizada para inocular uma placa contendo ágar MRS, que foi armazenada a  $4^\circ\text{C}$  por até 1 mês. Inóculo foi preparado através da transferência de células da placa contendo ágar MRS para 50 ml de meio líquido MRS, mantido em frasco tipo Erlenmeyer de 250 ml. Após aproximadamente 18 h de crescimento (densidade ótica  $\text{DO}_{600} = 6$ ) em um agitador orbital (220 rpm) a  $30^\circ\text{C}$  (Marconi), 6 ml de meio cultivado (6%) foram transferidos para o meio contendo o cultivo principal (silagem biológica).

### **3.6 Meios de preservação e de pré-cultivo**

As bactérias foram pré-cultivadas em caldo MRS (Man Rogosa & Sharpe), quimicamente definido, a fim de propagar o inóculo destinado à silagem biológica. Este meio contém (em g/L): peptona, 10g; extrato de levedura, 4g; extrato de carne, 8g; glicose, 20g; fosfato dipotássico, 2g; acetato de sódio trihidratado, 5g; citrato de amônia, 2g; sulfato de magnésio heptahidratado; 0,2g, sulfato de manganês tetrahidratado, 0,05g, sorbitano monooleato, 1g. Para o preparo do ágar MRS adicionou-se 15g de ágar para cada litro de caldo. Todos os componentes do meio foram misturados, ajustados a pH 6,7 e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

### **3.7 Cultivos (silagem biológica)**

Cultivos foram conduzidos em frascos tipo Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 g de substrato em BOD (Marconi) a 30°C (sem agitação e controle de pH) durante 120h. O início de cada cultivo deu-se pela adição de 6 ml de pré-cultura ( $DO_{600} = 6$ ), de forma que a concentração de inóculo no biorreator fosse 6% (v/p). Ao final de cada cultivo 25g de amostra foram coletadas assepticamente em câmara de fluxo laminar e imediatamente utilizadas para as análises microbiológicas. O material restante foi congelado a -18°C para depois ser utilizado em outras análises (Anexo). As formulações de meio de cultivo podem ser observadas no [Quadro 1](#).

**Quadro 1.** Composição dos meios de cultivo empregados

Tratamento	Composição (%)			
	CMS <sub>(1)</sub>	CP <sub>(2)</sub>	AMH <sub>(3)</sub>	MC <sub>(4)</sub>
A	-	80	20	-
B	-	90	10	-
C	-	100	-	-
D	-	80	-	20
E	-	90	-	10
F	-	100	-	-
G	80	-	20	-
H	90	-	10	-
I	100	-	-	-
J	80	-	-	20
K	90	-	-	10
L	100	-	-	-

CMS<sub>(1)</sub>: carne mecanicamente separada; CP<sub>(2)</sub>: concentrado proteico; AMH<sub>(3)</sub>: amido de milho hidrolisado; MC<sub>(4)</sub>: melaço de cana-de-açúcar.

### 3.8 Determinação do pH

Para a determinação do pH foi utilizado potenciômetro digital (Hanna).

### 3.9 Determinações microbiológicas

Para as silagens foram realizadas as determinações microbiológicas para bolores e leveduras (NBR 2750) e contagem total de mesófilos (NBR 3462) segundo a [ABNT \(1991\)](#) e para bactérias lácticas ([MAPA, 1992](#)).

### 3.10 Determinações químicas (composição das silagens)

As determinações químico-bromatológicas das silagens e dos meios serão realizadas com base na matéria seca de acordo com os procedimentos da [AOAC \(1995\)](#). A umidade foi determinada através do método gravimétrico, em estufa a 105°C até peso constante. O teor de cinza foi determinado pelo método gravimétrico, em mufla a 550°C e incineração da matéria orgânica em bico de Bunsen. O teor de proteína bruta foi determinado pelo método de

micro-Kjedahl e o extrato etéreo foi determinado após extração com éter de petróleo pelo método de Soxhlet. O conteúdo de carboidratos foi determinado por diferença.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Inóculos

Para estabelecer a concentração de inóculo inicial (6% meio de cultura,  $DO_{600} = 6$ ) em termos de contagem de microrganismos (UFGC/g) foram feitas cinéticas de crescimento em meio MRS para cada uma das linhagens de bactéria láctica estudada. Ao atingir-se a referida DO, em tempos que variaram de 16-20h, dependendo da espécie, procedeu-se com a inoculação de diversas placas de petri contendo meio ágar MRS e meio PCA em diversas diluições. Obtiveram-se contagens de  $3,90 \times 10^7$ ,  $4,1 \times 10^7$ ,  $2,3 \times 10^8$ ,  $1,3 \times 10^9$  e  $2,2 \times 10^8$  UFC/g para *Pediococcus acidilactici*, *Oneococcus oeni*, *Lactobacillus sakei*, *Weissella viridescens* e *Lactobacillus acidophilus*, respectivamente. Os diferentes valores obtidos entre as espécies pode ser devido às diferenças na morfologia das células, como um menor volume, que não podem ser determinadas por espectrofotometria, método indireto de determinação da concentração celular. Neste caso, apesar da  $DO_{600}$  ter sido a mesma, o maior número de células no meio líquido foi provavelmente responsável pelo maior número de células detectado durante as contagens em placas.

Estes experimentos também serviram para avaliar a confiabilidade do método de contagem microbiana em meio PCA em relação ao ágar MRS para o cultivo de uma cultura pura de bactérias lácticas. Os resultados apresentaram correlação entre a contagem de bactérias lácticas e contagem de microrganismos mesófilos totais (BAL/MES) de 0,94, 0,94, 1,07, 0,95 e 1,03 para *P. acidilactici*, *O. oeni* e *L. sakei*, *W. viridescens* e *L. acidophilus*, respectivamente. Devido a alta correlação obtida para culturas puras, avaliou-se também esta relação após os 4 dias de cultivo das silagens biológicas, a fim de avaliar a competição entre a espécie inoculada e os microrganismos mesófilos presentes nos meios pasteurizados. Meio PCA acrescido de púrpura de bromocresol 0,1% também tem sido utilizado para quantificar o crescimento de bactérias lácticas. O púrpura de bromocresol evidencia o crescimento bacteriano, pois quando o pH do meio baixa a coloração inicialmente púrpura

muda para amarela. Contudo esta metodologia ainda precisa ser testada para verificar se é possível substituir-se o ágar MRS, de custo maior.

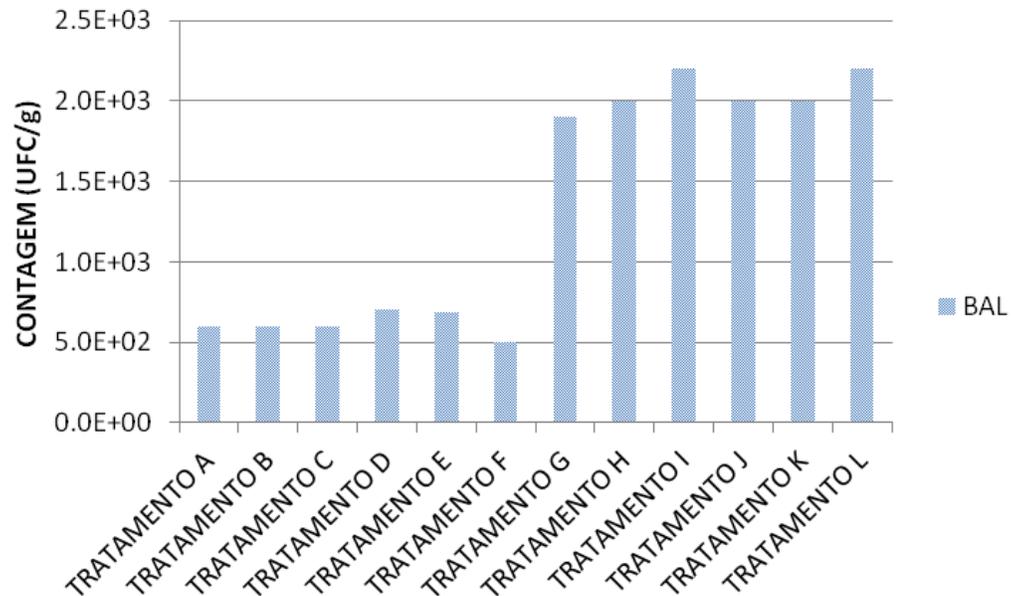
#### 4.2 Substratos

As Figuras 1, 2, 3 e 4 mostram as contagens em (UFC/g) e (log UFC/g) para os diferentes tratamentos pasteurizados (A-L) avaliados neste estudo para bactérias lácticas (BAL), microrganismos mesófilos totais (MES) e fungos (FUN), respectivamente. Antes de optar-se pela pasteurização, avaliaram-se os meios C (=F) e I (=L) *in natura*, pasteurizados e esterilizados. Não foram obtidas diferenças para a pasteurização e esterilização (resultados não mostrados). Contudo, optou-se pela pasteurização, pois não houve alteração das características físicas dos meios (diferentemente da esterilização, que liquefaz o substrato cárneo, além de ter caramelizado tanto o amido de milho hidrolisado quanto o melado de cana-de-açúcar) e pelo custo inferior desta operação. Os meios *in natura* apresentaram maior contaminação inicial (resultados não mostrados).

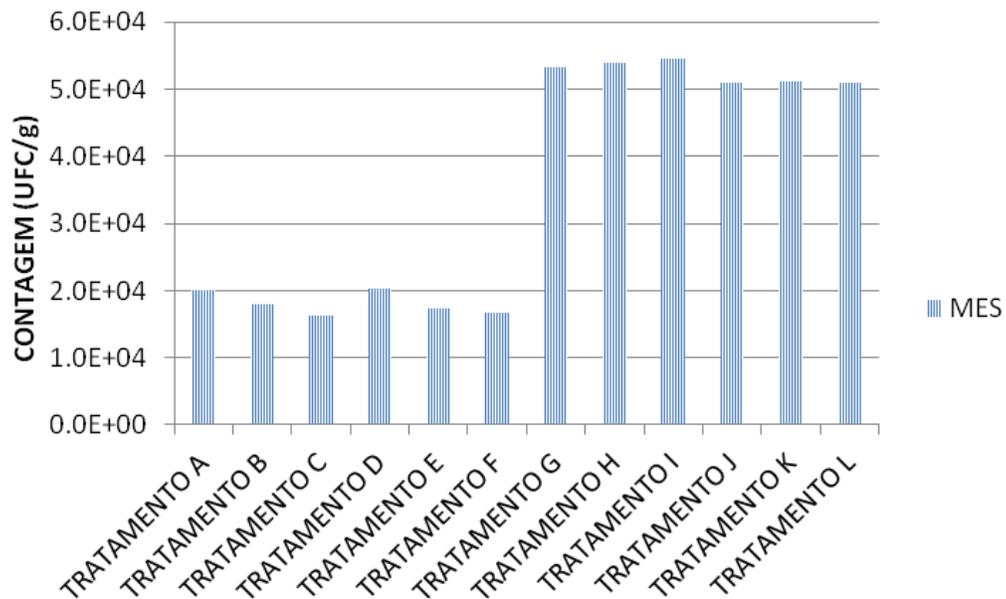
A redundância na composição de alguns substratos C (=F) e I (=L) permitiram um conjunto maior de análises estatísticas, como o cálculo do erro experimental, além de permitir uma melhor visualização dos resultados. A representação das contagens também em termos de log UFC/g objetivou a melhor visualização dos dados experimentais, pois devido a maior variação da grandeza contagem (UFC/g), nem sempre foi possível a observação adequada dos resultados enquanto na forma gráfica. Isto também facilitou a comparação das três espécies em uma mesma figura.

A maior concentração de bactérias lácticas (naturalmente presentes) ocorreu nos substratos a base de CMS (G-L) em relação aqueles à base de concentrado proteico de CMS (A-F), apresentado em média concentrações de  $2 \times 10^3$  e  $5 \times 10^2$  UFC/g, respectivamente (Figura 1). Contudo, estes valores representam apenas de 3,0 a 4,3% do total de microrganismos presentes nos substratos pasteurizados não inoculados (Quadro 2). O mesmo comportamento foi observado para os microrganismos mesófilos que apresentaram em média concentrações de  $2 \times 10^4$  e  $5 \times 10^4$  UFC/g para meios a base de CMS e concentrado proteico de CMS, respectivamente (Figura 2). Uma pequena concentração de fungos variando de  $5 \times 10^1$  a  $2,5 \times 10^2$  UFC/g foi obtida (Figura

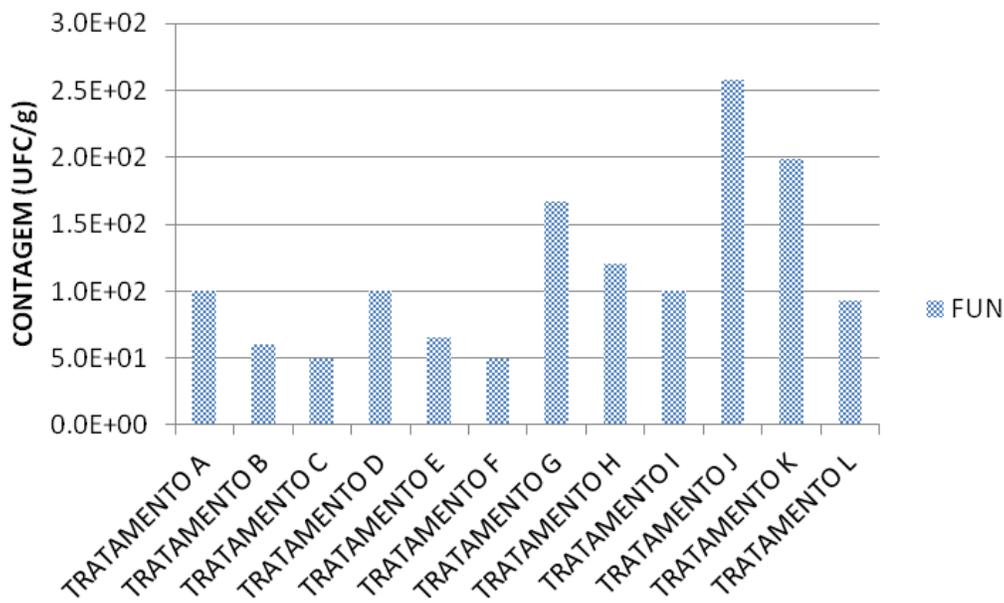
3). Neste último caso também é nítida a maior concentração de fungos quanto maior fosse à concentração da fonte de carbono vegetal. Não foi detectada a presença de fungos nos meios fermentados.



**Figura 1.** Contagem de bactérias lácticas (BAL) em UFC/g antes da inoculação em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).



**Figura 2.** Contagem de microrganismos mesófilos totais (MES) em UFC/g antes da inoculação em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

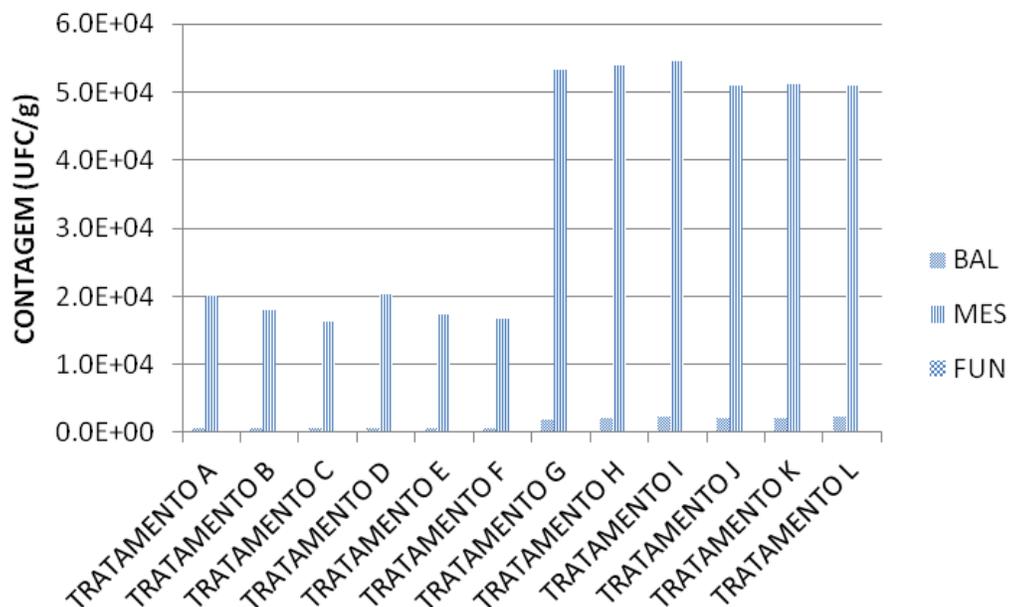


**Figura 3.** Contagem de fungos (FUN) em UFC/g antes da inoculação em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

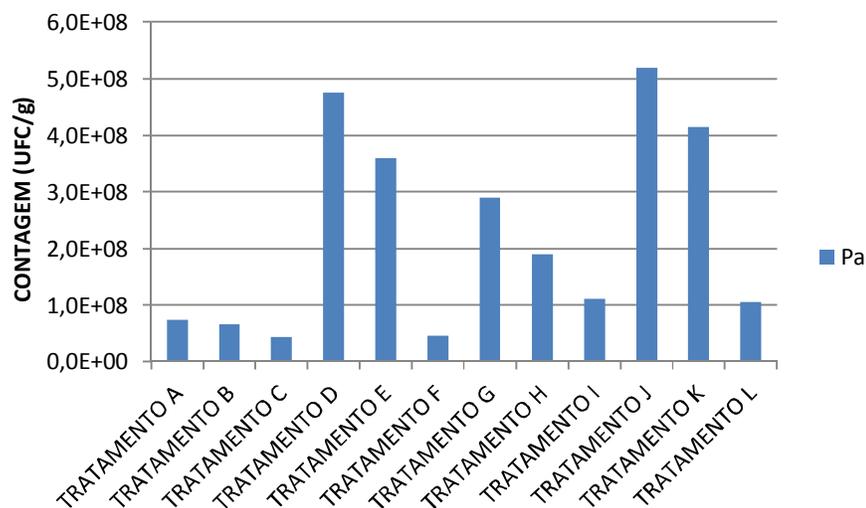
A [Figura 4](#) permite a comparação entre as contagens de bactérias lácticas (BAL), microrganismos mesófilos totais (MES) e fungos (FUN) antes da inoculação nos diferentes meios. Através dela é possível evidenciar-se a ordem de grandeza dos microrganismos presentes e o perfil de crescimento em cada formulação de meio. Percebe-se a concentração inicial de microrganismos no meio de cultivo foi no mínimo  $10^3$  vezes inferior à concentração de inóculo fornecida.

### 4.3 Cultivos

A [Figura 5](#) apresenta a contagem de bactérias lácticas *P. acidilactici* enquanto a [Figura 6](#) indica a contagem de microrganismos aeróbios totais em termos de UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L). As [Figuras 7 e 8](#) indicam de maneira análoga os crescimentos de *O. oeni* e o total de microrganismos presentes nos meios, enquanto as [Figuras 9 e 10](#) são referentes aos cultivos com *L. sakei*, indicando o total de bactérias lácticas presentes ao final do cultivo bem como a população total de microrganismos, respectivamente.



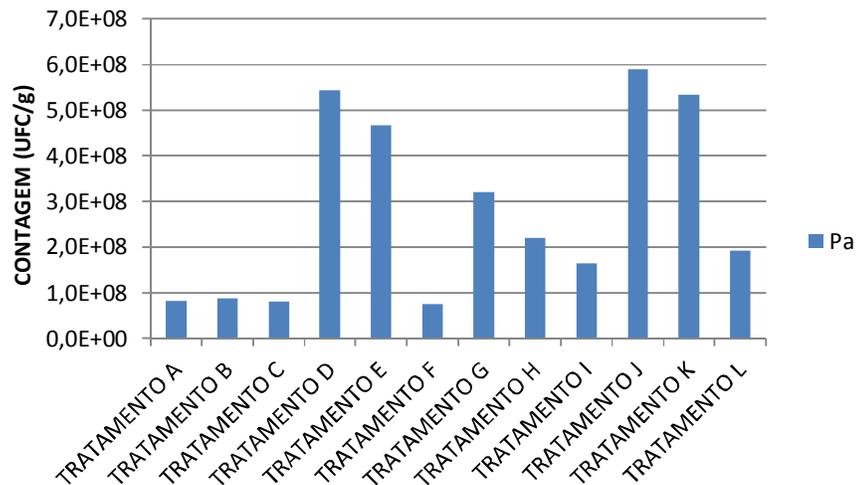
**Figura 4.** Comparação entre as contagens de bactérias lácticas (BAL), microrganismos mesófilos totais (MES) e fungos (FUN) em UFC/g antes da inoculação em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).



**Figura 5.** Contagem de bactérias lácticas *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L).

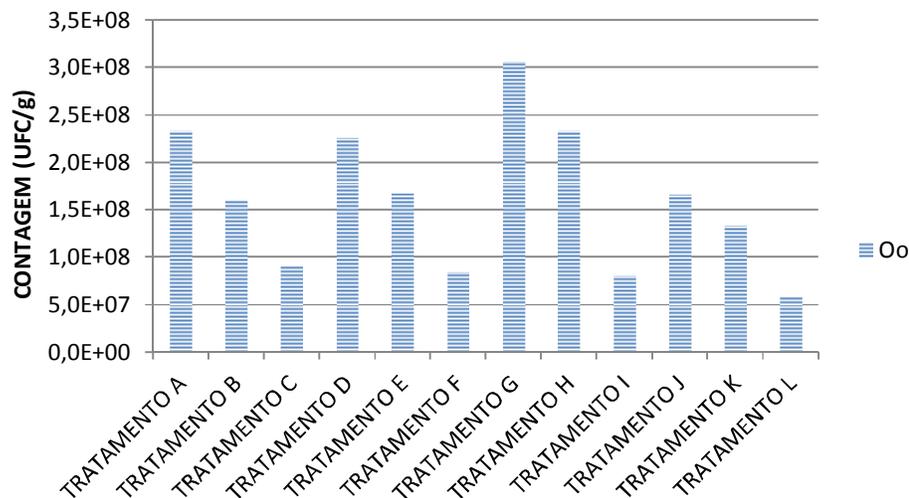
Percebe-se que a concentração final de *P. acidilactici* foi superior nos meios contendo 20% de MC e 80% de concentrado proteico de CMS (meio D) e 20% de MC e 80% de CMS (meio J). Nos meios contendo AMH também é

evidente que quanto maior o conteúdo desta fonte de carbono, maior a concentração da bactéria láctica. Contudo a diferença não foi tão grande quanto em presença de MC (Figura 5).



**Figura 6.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

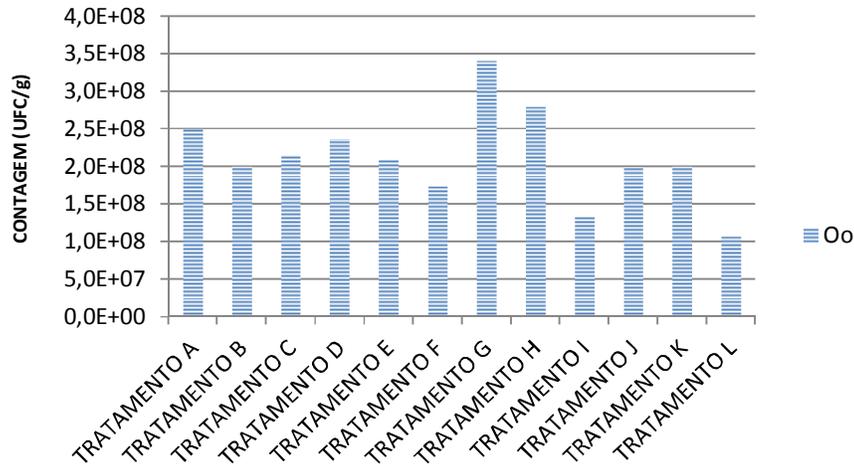
O mesmo comportamento é observado para os microrganismos mesófilos totais (Figura 6). O Quadro 2 mostra que quanto maior a concentração da fonte de carbono MC ou AMH, maior a relação BAL/MES, indicando que o açúcar ou melaço favoreceu o crescimento de *P. acidilactici* em sua competição com outros microrganismos já presentes no substrato.



**Figura 7.** Contagem de bactérias lácticas *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

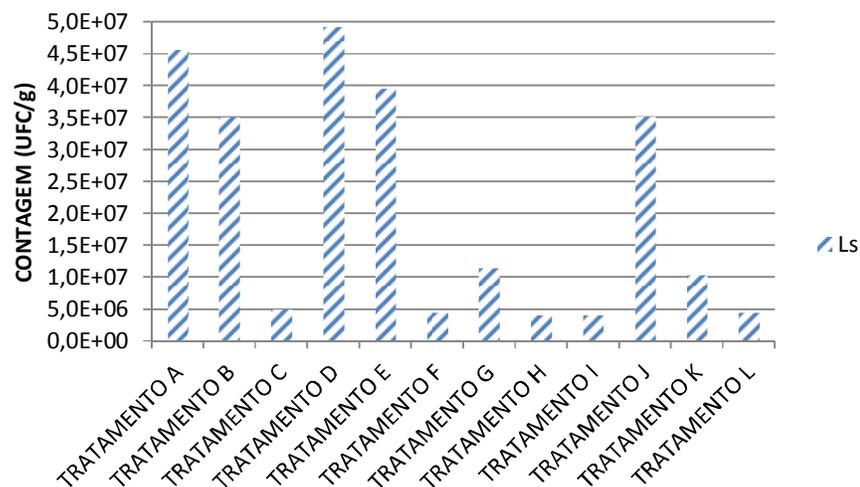
Um comportamento semelhante foi observado para os cultivos com *O. oeni*, contudo não é possível observar a preferência desta espécie por uma das fontes de carbono principais (MC ou AMH), nem uma diferença acentuada quando comparado o crescimento na presença ou ausência desta fonte (Figura 7).

Novamente o perfil de crescimento de microrganismos mesófilos totais se compara ao das bactérias lácticas (Figura 8). Isto era esperado haja visto que houve uma relação entre o crescimento de *O. oeni* e o de microrganismos totais, conforme observado no Quadro 2, de forma semelhante ao encontrado para *P. acidilactici*. Quanto maior a concentração da fonte de carbono MC ou AMH, maior a relação BAL/MES, indicando que o açúcar ou melaço favoreceu o crescimento de *O. oeni* em sua competição com outros microrganismos já presentes no substrato.



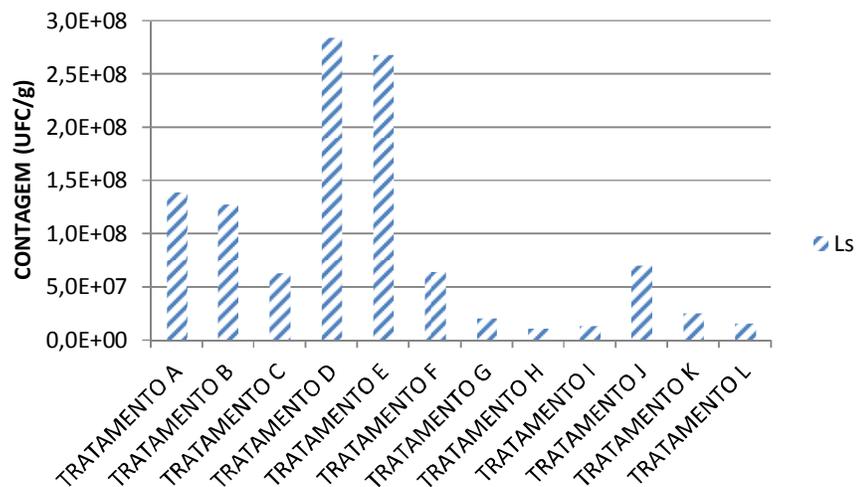
**Figura 8.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

Apesar das fontes de carbono amilácea e sacarínea terem favorecido o crescimento de *L. sakei* em comparação aos tratamentos sem esta suplementação (ou em uma concentração inferior), o crescimento desta bactéria foi muito inferior às demais bactérias lácticas (Figura 9). Neste caso a população final deste microrganismo foi inclusive inferior àquela inoculada.



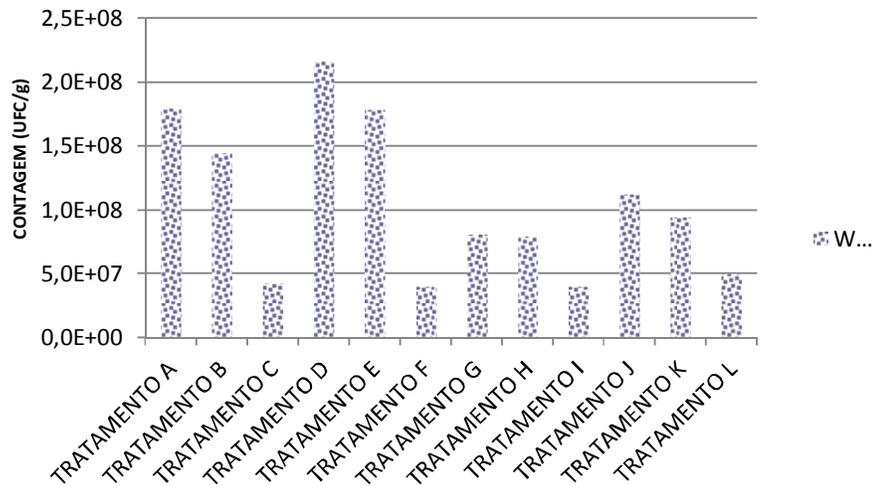
**Figura 9.** Contagem de bactérias lácticas *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

Para os microrganismos mesófilos totais a ordem de grandeza das contagens foi em torno de 10 vezes superior a das bactérias lácticas (Figura 10). No máximo 50 e 55% das bactérias lácticas permaneceram viáveis após os 4 dias de cultivo, quando na presença de 20% MC / 80 % CMS e 20% AMH / 80% CMS, respectivamente. Sem a fonte de carbono vegetal, a relação BAL/MES foi de 29% em meio com CMS e 7,5% em meio com concentrado proteico de CMS (Quadro 2).

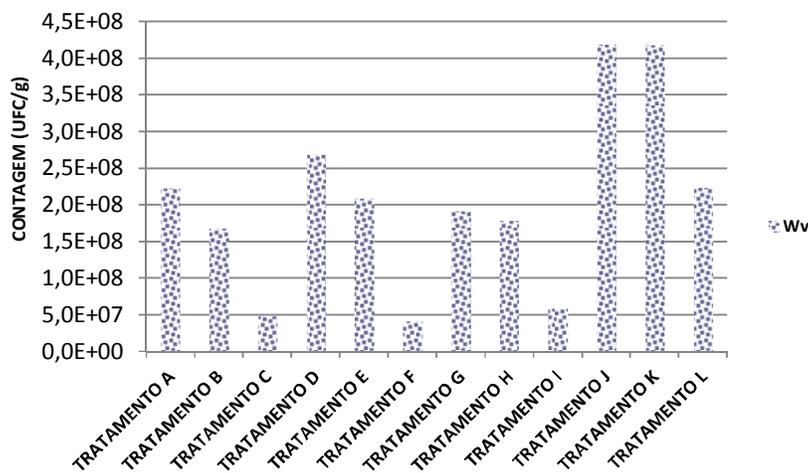


**Figura 10.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

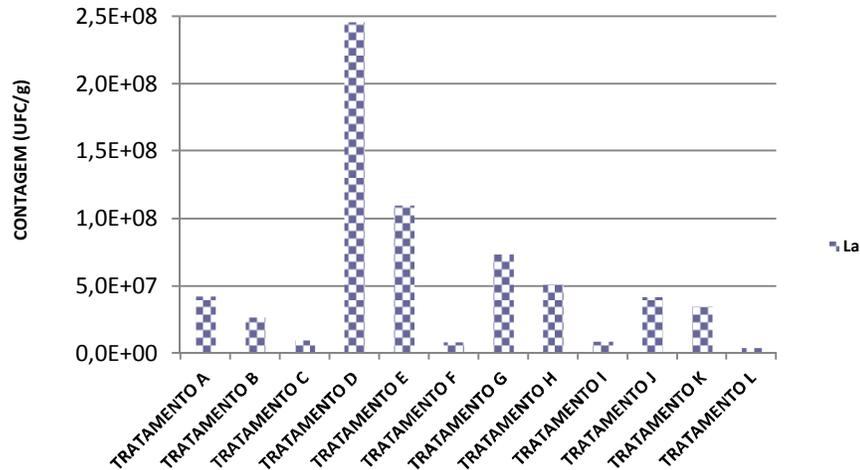
As Figuras 11 e 12 indicam de maneira análoga os crescimentos de *W. viridescens* e o total de microrganismos presentes nos tratamentos, enquanto as Figuras 13 e 14 são referentes aos cultivos com *L. acidophilus*, indicando o total de bactérias lácticas presentes ao final do cultivo bem como a população total de microrganismos, respectivamente.



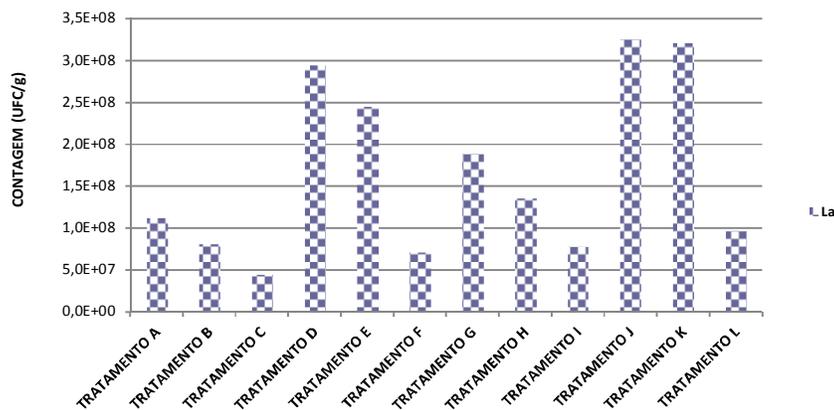
**Figura 11.** Contagem de bactérias lácticas *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L).



**Figura 12.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).



**Figura 13.** Contagem de bactérias lácticas *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).



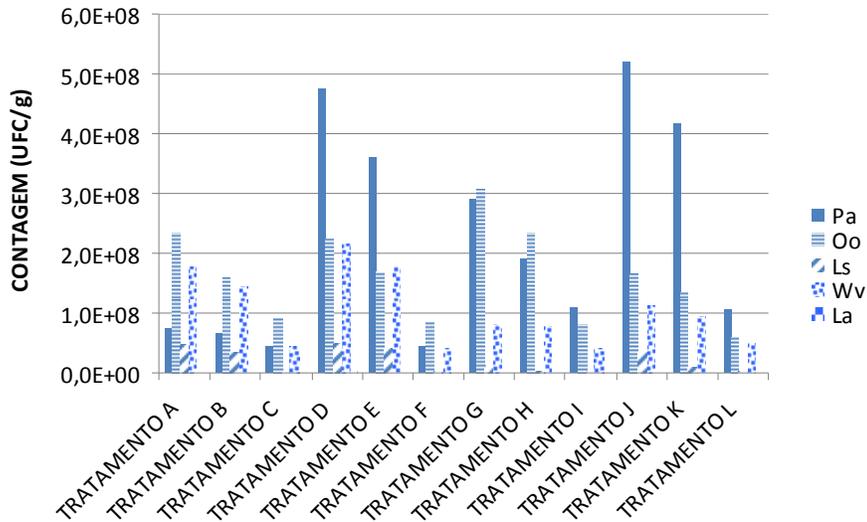
**Figura 14.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

Através da [Figura 15](#) é possível observar-se as diferenças entre as três espécies de bactérias lácticas estudadas em termos de contagem de unidades formadoras de colônias. Percebe-se que *P. acidilactici* foi bastante superior às demais espécies enquanto crescido em meio contendo melão de cana-de-açúcar. Já *O. oeni* mostrou comportamento semelhante em relação às duas

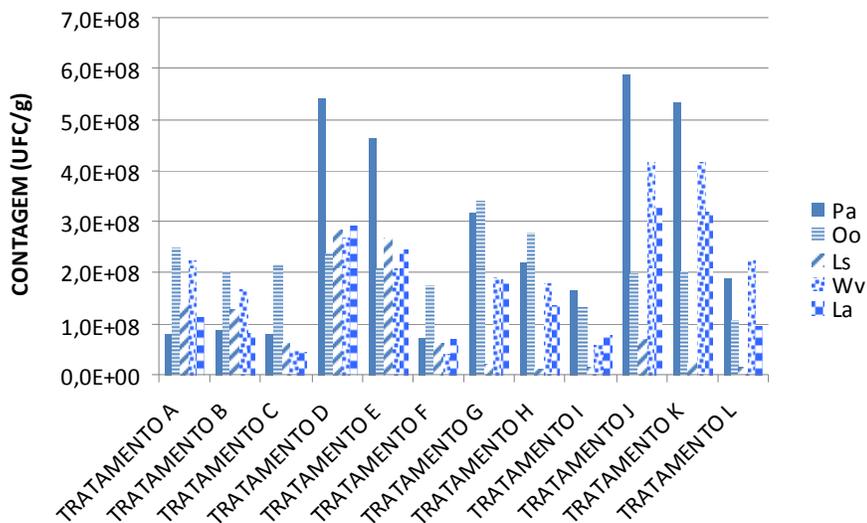
fontes de carbono de origem vegetal estudadas e crescimento maior que *P. acidilactici*. *L. sakei*, que apresentou bom crescimento em nenhum dos meios estudados, o que pode ser observado pelas características finais do produto obtido, que foram cheiro forte e desagradável, principalmente quando no meio não havia a presença da fonte de carbono (amilácea ou sacarínea). Para os outros dois microrganismos o produto final obtido foi a silagem biológica e a principal característica sensorial observada foi o aroma de leite fermentado, cuja intensidade variou em função da concentração da fonte de carbono vegetal: quanto maior a concentração da fonte de carbono, maior a intensidade do aroma. Outras características importantes observadas foram a liquefação completa do meio sólido e a formação intensa de bolhas devido à produção de CO<sub>2</sub>.

Adams et al. (1987) estudaram a fermentação de pescados e observaram que *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* mostraram que a relação de fermentação aumenta conforme o teor de glicose ou sacarose utilizado. Tais autores afirmaram que cada fermentação depende da microbiota acompanhante, da composição do alimento, da atividade de água, do pH, da concentração de NaCl e da temperatura de processo.

A Figura 16 mostra a comparação entre as contagens de microrganismos mesófilos totais após 4 dias de cultivo com *P. acidilactici*, *O. oeni* ou *L. sakei* em diferentes meios. Um comportamento semelhante ao das bactérias lácticas foi observado para os microrganismos mesófilos, especialmente quando as bactérias lácticas utilizadas como inóculo foram *P. acidilactici* e *O. oeni*. No entanto, a concentração de microrganismos mesófilos provenientes dos cultivos com *L. sakei* foi bem maior do que o crescimento da própria *L. sakei*, porque as bactérias lácticas não predominaram nestes experimentos (Quadro 2), principalmente em meios a base de concentrado proteico de CMS (Figura 16). Assim, a maior concentração de mesófilos deveu-se à presença de outros microrganismos competidores, não inoculados.



**Figura 15.** Comparação entre as contagens de bactérias lácticas em UFC/g após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).



**Figura 16.** Comparação entre as contagens de microrganismos mesófilos totais em UFC/g após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

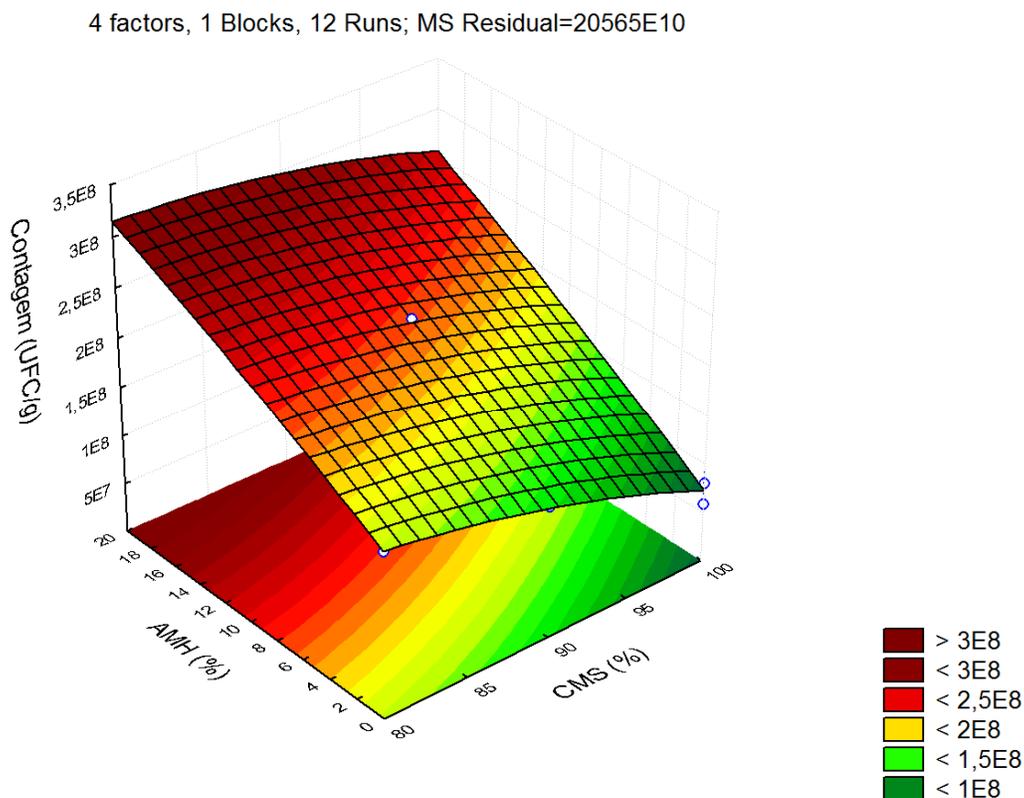
*P. acidilactici* é a principal cultura iniciadora utilizada na manufatura de produtos cárneos devido a sua grande atividade bactericida (Nielsen, 1990), tendo neste estudo apresentado também excelente resultado em termos de competição com outros microrganismos. *L. sakei* é frequentemente reportado como microrganismo dominante em processos fermentativos (Rantsiou et al., 2005), contudo para os substratos cárneos estudados não apresentou os resultados esperados.

Dependendo da linhagem, determinada espécie pode ou não ter efeito bactericida e ser empregada com sucesso em fermentação de produtos cárneos. *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, por exemplo, é definida como microrganismo bacteriocinogênico, sendo utilizada como controle negativo em estudos do gênero (Barbagallo et al., 2004).

**Quadro 2.** Conteúdo de bactérias lácticas em relação ao conteúdo de microrganismos mesófilos totais em diferentes meios pasteurizados (A-L) não inoculados (S/I: sem inoculação) e após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La)

Tratamento	Bactéria láctica (%)					
	S/I	Pa	Oo	Ls	Wv	La
A	3,0	89,9	93,2	32,8	80,4	37,9
B	3,4	75,8	80,4	27,5	86,0	33,7
C	3,7	53,5	42,4	7,9	88,6	22,3
D	3,4	87,6	95,3	17,3	80,7	83,7
E	4,0	77,1	79,9	14,8	85,3	44,9
F	3,0	60,1	48,6	7,0	96,5	11,5
G	3,6	90,6	90,2	54,3	42,5	39,0
H	3,7	86,4	83,4	36,4	44,6	38,1
I	4,0	67,6	60,6	29,6	67,6	11,1
J	3,9	88,0	83,6	50,0	26,8	12,9
K	3,9	77,7	66,7	40,7	22,6	10,9
L	4,3	55,3	54,8	28,1	22,5	4,2

A **Figura 17** representa uma superfície de resposta para o crescimento de *O. oeni* após 4 dias de cultivo em função das concentrações de AMH e de CMS. Demais variáveis (MC e concentrado proteico de CMS) foram fixadas em 0%. O perfil obtido indica que a medida que aumenta-se a concentração de AMH e diminui-se a de CMS, maior a concentração final de bactérias lácticas ( $R^2 = 0,9772$ ). Para os outros microrganismos também se obtiveram elevadas correlações ( $R^2 = 0,9772$  e  $R^2 = 0,9772$  para *P. acidilactici* e *L. sakei*, respectivamente).



**Figura 17.** Superfície de resposta para o crescimento da bactéria láctica *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo) após 4 dias de cultivo em função da concentração de amido de milho hidrolisado (AMH) e carne mecanicamente separada (CMS) de pescado. Demais variáveis (melaço de cana-de-açúcar e concentrado proteico de CMS de pescado) foram fixadas em 0%.

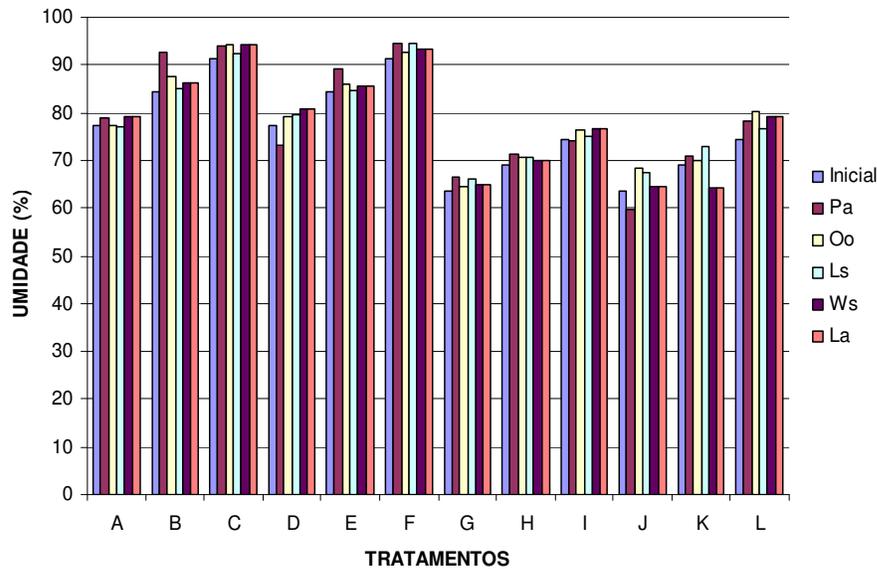
Pelo exame visual das silagens, observou-se que a liquefação da massa homogênea iniciou-se entre o 2º e 3º dias e aumentou, gradativamente, até o final do experimento resultando num produto com característica líquido-pastosa, corroborando o observado por [Hardy et al. \(1983\)](#). Este aspecto é resultado da contínua hidrólise protéica que acontece na silagem devido à ação das enzimas proteolíticas naturalmente presentes no pescado, principalmente nas vísceras e/ou adicionadas ([Haard et al., 1985](#); [Kompiang, 1981](#)).

A silagem biológica apresentou uma coloração marron claro nos tratamentos com A.M.H (A-F) e marron escura, confirmando o relatado por [Valério \(1994\)](#) e [Morales-Ulloa e Oetterer \(1995\)](#). Essa coloração pode ser resultado da reação de Maillard, em decorrência da presença do melaço como fonte de carboidrato e dos aminoácidos livres, propiciando a ocorrência dessa reação ([Fagbenro 1994](#); [Fagbenro e Jauncey, 1998](#)).

A silagem biológica apresentou aroma “doce-acidificado” devido à adição do melaço, que descaracteriza de certa forma o aroma ácido encontrado nas silagens ácida e enzimática estando de acordo com o relatado por [Morales-Ulloa \(1994\)](#).

Como esperado, a CMS lavada duas vezes apresentou maior teor de umidade ([Figura 18, tratamentos A-F](#)), seguida da outra CMS não lavada ([Figura 18, tratamentos G-L](#)).

Relatos de aumento de umidade em CMS lavadas tem sido encontrados na literatura como o de [Gryschek et al., \(2003\)](#) com tilápia do Nilo, que obteve resultados de 78,50%, 85,90% e 86,70% para a umidade da CMS não lavada, com 1 lavagem e com 2 lavagens respectivamente. [Kirschnik e Macedo-Viegas \(2009\)](#) obtiveram com tilápias do Nilo teores entre 79,83% (CMS sem lavar) e 88,78% (CMS lavada). [Oliveira-Filho \(2009\)](#) avaliou a composição química de salsichas elaboradas com CMS de tilápia do Nilo submetida ou não a lavagem e também observou o aumento da umidade com as lavagens de 81,25% (sem lavar) para 87,99% (2 lavagens). Todos os estudos citados, no entanto, obtiveram valores maiores de umidade para as CMS lavadas, corroborando com o presente estudo com o Pintado.



**Figura 18.** Comparação entre a umidade dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).

Hassan e Heath (1986) verificaram um aumento de proteínas e lipídios em silagem de pescado com adição de lactose, após fermentação de *L. plantarum*. Estes resultados estão de acordo com o presente trabalho quando houve adição de A.M.H e utilização do inóculo *W. viridescens*.

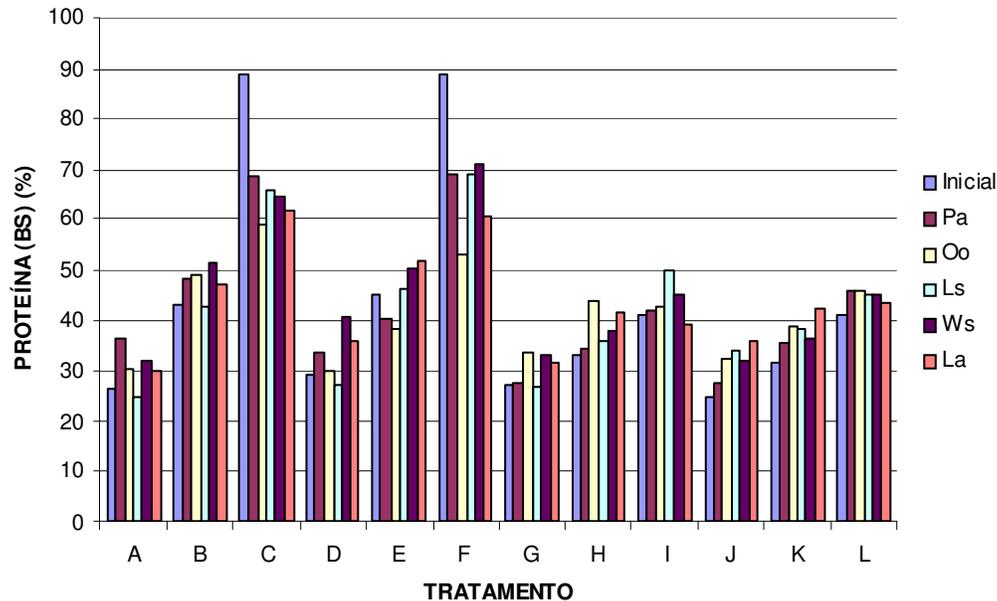
Morales-Ulloa e Oetterer (1997) verificaram que para a silagem biológica preparadas com o *P. acidilactici* mais o melaço ocorreram uma diminuição no teor de certos aminoácidos. No presente trabalho comparando *P. acidilactici* e *W. viridescens* no experimento contendo melaço, percebeu-se que a primeira espécie produziu menos proteína bruta que a segunda. O *Weissella* (Figura 19) provavelmente utilizou o carboidrato e o converteu em proteína, exceto nos dois casos (C-F), a concentração inicial já era elevada; ele foi obrigado a fazer o uso dessa proteína para crescer e se manter vivo. Em geral ao final dos cultivos houve um pequeno incremento de conteúdo protéico.

Uma menor quantidade de proteína bruta na silagem biológica ocorre devido à adição do melaço, que leva a uma diluição do sistema, pela

incorporação de umidade e sólidos (Morales-Ulloa e Oetterer, 1995). A composição da silagem se apresenta muito próxima à matéria-prima, portanto os teores de proteína bruta podem variar consideravelmente dependendo do material utilizado na sua elaboração. A metodologia também pode interferir na composição devido à diluição provocada pelos ácidos, soluções inóculo e melaço. Hossain et al. (1997) elaboraram silagens ácidas com diferentes matérias-primas (peixes inteiros descartados) utilizando o ácido sulfúrico e o ácido fórmico. Oliveira (2003), trabalhando com a silagem ácida, elaborada com sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) inteiras, utilizando 3,5% (v/p) de uma mistura (3:1) de ácido sulfúrico: fórmico, obteve teor de PB de 58,71 g/100g. Valério (1994) elaborou silagem enzimática de sardinha (*Sardinella brasiliensis*), utilizando a enzima protease, e obteve valor de PB de 65,07 g/100g. Este trabalho obteve teores máximos bem próximos a estes resultados.

March et al. (1963) estudaram a produção de silagem ácida a partir de vísceras de pescado branco com a adição de 3% de ácido fórmico. Estes autores obtiveram valores de proteína 13,5% a 15,4%, sendo inferiores aos encontrados no presente estudo.

Quando foi realizada a silagem biológica com concentrado protéico houve variação protéica de 27% a 68% de proteínas, e quando o substrato foi CMS os valores obtidos foram 26% a 50% (Figura 19).



**Figura 19.** Comparação entre a proteína dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).

A diminuição do teor de lipídios das silagens com relação à matéria-prima foi devido à retirada da porção lipídica sobrenadante na lavagem. Alguns autores citam que esta fração interfere na qualidade da silagem, pois como os ácidos graxos que constituem a fração lipídica do pescado são, predominantemente, insaturados, estes podem oxidar facilmente resultando em alterações de sabor, cor, textura, valor nutricional, além de serem considerados potenciais produtores de componentes tóxicos (FAO, 2003; Raa e Gilberg, 1982; Sales, 1995). O processo oxidativo pode ser acelerado se a silagem de pescado estiver em contato com a luz e o ar (FAO, 2003).

De acordo com Nelson e Cox (2000) a oxidação de lipídios pode causar a formação de peróxidos que podem complexar as proteínas através de ligações físicas e covalentes. Essas ligações covalentes entre produtos oxidados e proteínas podem destruir aminoácidos como o triptofano, oxidar metionina e ligar a lisina a outros compostos tornando estes aminoácidos indisponíveis (Sales, 1995).

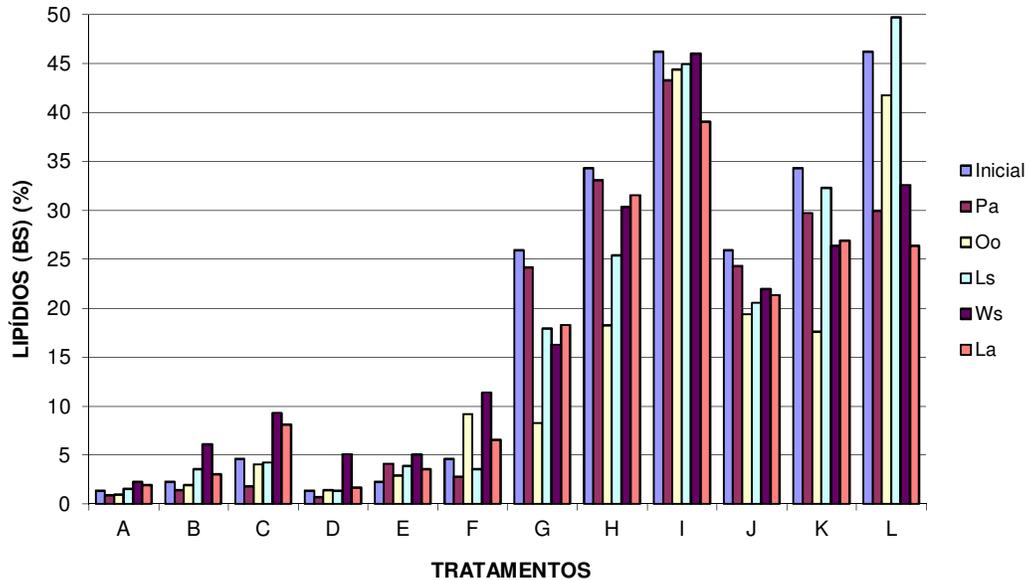
Portanto, devido a todos estes fatores existem autores (Disney et al., 1977; Kompiang, 1981; Raa e Gilberg, 1982; Tatterson e Windsor, 1974) que defendem a retirada da fração lipídica, durante a elaboração da silagem, para a obtenção de um produto uniforme e de maior estabilidade.

Vidotti (2001) encontrou valores para o teor de lipídios de 42,9%. Esse valor está próximo ao resultado obtido neste experimento.

Os resultados obtidos para a fração lipídica por Fagbenro (1996) e Fagbenro e Jauncey (1995a), trabalhando com a silagem biológica foram 10,86 e 10,63 g/100g, respectivamente. Estes resultados estão acima do encontrado na primeira série CP. Em geral aumenta os lipídios. Na série CMS houve diminuição dos lipídios, pois os microorganismos usaram os lipídios para crescerem. O que menos utilizou os lipídios para crescer foi o *Pediococcus* (Figura 20). O sakei é bem provável que tenha havido um erro experimental, inclusive ele até sintetizou lipídios.

Segundo Santos et al. (2006) com base nos dados obtidos durante a fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*) utilizando cepa isolada de *L. sakei*, 4% glicose é a concentração ideal para induzir o crescimento da referida bactéria láctica. Segundos os mesmos autores, a concentração de 6% glicose não possibilitou a redução na concentração de nitrogênio solúvel, que provavelmente ocorreu devido ao fato de a cepa de *L. sakei* não metabolizar o excesso de glicose e, com isso, disponibilizar o carboidrato para possível utilização pelos microorganismos deterioradores.

Com base nesses dados podemos concluir que o *L. sakei* o presente trabalho, chegou ao final da fermentação com baixo número de células, devido ao excesso de carboidrato (20% e 10%) utilizado no experimento. Segundo Jonson et al. (1985) em presença de excesso de açúcar, pode ocorrer um aumento de produtos da reação de Maillard. A perda de aminoácidos durante o armazenamento de silagens biológicas pode ser devida a interação com os açúcares não utilizados (James et al., 1977).



**Figura 20.** Comparação entre os lipídios dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) e *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

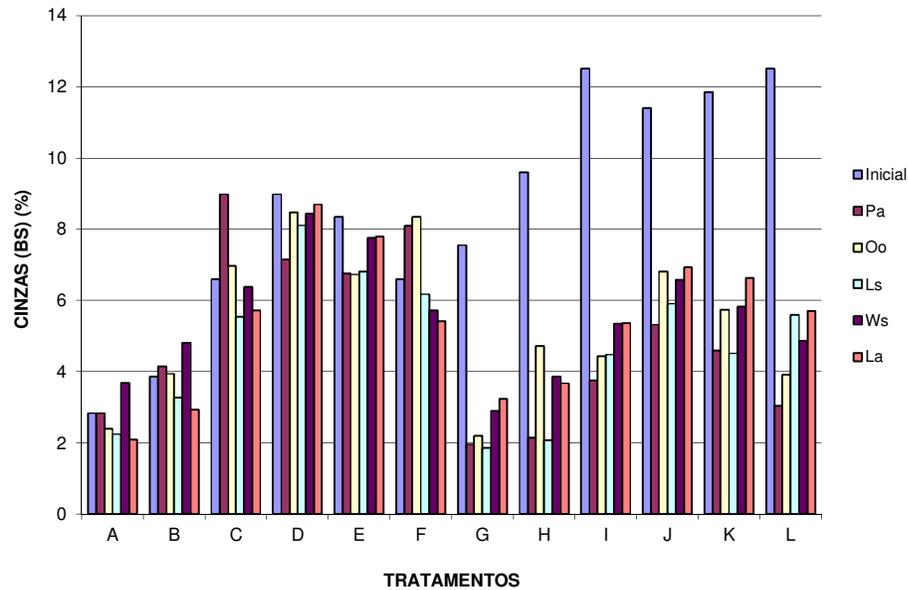
Os teores elevados de cinza, observados nas silagens ácida, biológica e enzimática, estão diretamente relacionados com a presença de grande quantidade de escamas, cabeça, coluna vertebral, ossos e nadadeiras na matéria-prima utilizada para a elaboração das silagens.

Gonçalves e Viegas (2007) verificaram que os resíduos de camarão apresentaram elevados teores de cinzas (48%), que diminuíram com o processo de fermentação. A diminuição de cinzas também foi observada por Meyers e Benjamin (1987) em silagens ácidas, e por Fox et al. (1994) e Fagbenro (1996) em silagens fermentadas de cabeças de camarão. No presente estudo também houve redução das cinzas, pois os microorganismos fizeram uso delas para crescer (figura 21).

Segundo Hammoumi et al (1998) na caracterização de pescado fermentado verificaram um elevado teor de cinzas que era devido à abundância de ossos nos resíduos e também para o conteúdo mineral do melaço. Esses resultados estão de acordo com o presente estudo, pois a matéria prima utilizada foi a CMS.

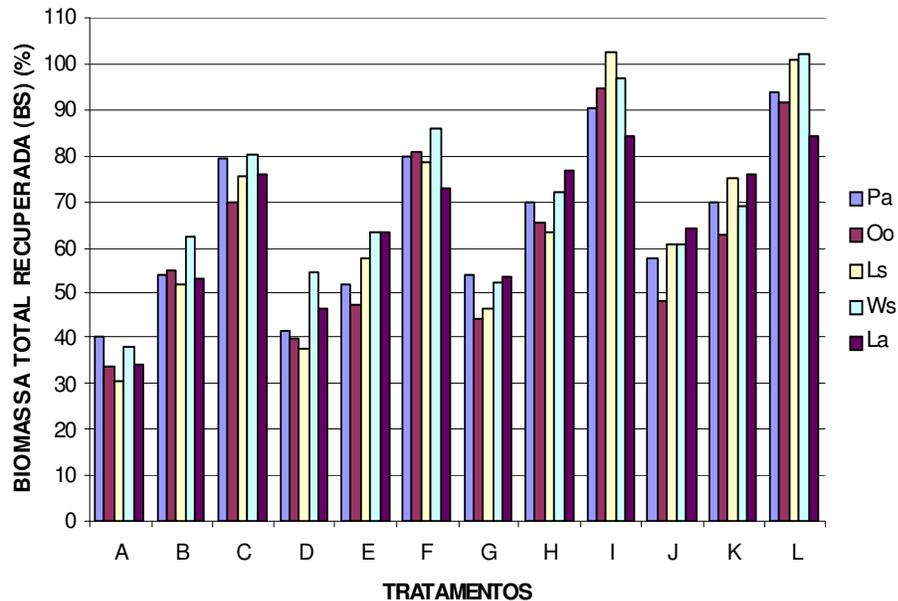
[Hammoumi et al. \(1998\)](#) relataram a degradação da matéria orgânica por microorganismos e / ou por suas enzimas que é inevitável durante o processo. Isto pode resultar em quantidades relativamente elevadas de compostos voláteis. Segundo [Stone e Hardy \(1986\)](#), durante o processo de silagem, as proteínas são hidrolisadas pelas enzimas e o nitrogênio se torna mais solúvel. A proteólise na pele e vísceras é maior durante as primeiras 24 horas. O teor de solúvel aumenta de 10 a 20% nos primeiros dias de armazenagem. Transcorridos os primeiros 3 dias de ensilagem, 50% do total de nitrogênio está sob a forma de nitrogênio não proteico e o teor de aminoácidos livres aumenta rapidamente durante os cinco primeiros dias ([Backhoff, 1976](#)). A putrefação é inibida pelo teor de ácido do meio, sabendo-se, no entanto que o nitrogênio volátil é um dos compostos resultantes da decomposição proteica ([Raa e Gildberg, 1982](#)).

De uma maneira geral, podemos observar que a composição centesimal é extremamente variável de uma espécie de pescado para outra e em uma mesma espécie dependendo da época do ano, do tipo de alimentação, do grau de maturação gonadal, sexo e, em um mesmo peixe, vai variar dependendo da parte analisada ([Sales,1995](#)). Como a composição da silagem é muito semelhante à matéria-prima, o valor nutricional da silagem também vai variar segundo os fatores supracitados.



**Figura 21.** Comparação entre as cinzas dos meios de cultivos (%) antes da inoculação (inicial) e após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) e *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

A comparação entre a biomassa total não chegou em 100%; primeiro que o carboidrato não foi medido; segundo o nitrogênio é liberado para atmosfera; terceiro o carbono é liberado na forma de dióxido de carbono, e quarto o próprio carbono que o microorganismo utiliza para se manter vivo (Figura 22).



**Figura 22.** Comparação entre a biomassa total recuperada após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) e *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes tratamentos pasteurizados (A-L).

#### 4 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou como a utilização dos coprodutos de uma planta de processamento de pescado da região pode representar uma alternativa ecologicamente correta e economicamente viável dentro da cadeia do pescado, através da geração de um produto de maior valor agregado e nutricional: a silagem biológica.

Concluiu-se que houve diferenças no metabolismo das diferentes bactérias estudadas em relação aos diferentes substratos disponibilizados.

*P. acidilactici* apresenta amplo crescimento nos tratamentos contendo MC e A.M.H o que permite melhor utilização desta linhagem. Enquanto que *P. acidilactici* NRRL B-14958 e *O. oeni* predominaram sobre os demais microrganismos, *L. sakei* perdeu viabilidade durante o cultivo, apresentado ao final do mesmo população inferior à inoculada. Uma melhor compreensão destas diferenças foi possível através da avaliação da variação da composição dos tratamentos, principalmente no que se refere a proteínas.

## 5 REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. 1991.

Adams, M. R.; Cooke, R. D.; Twiddy, D. R. Fermentation parameters involved in the production of lactic acid preserved fish-glucose substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 22, n. 2, p.105-114, 1987.

ADU, G.A.; BABBIT, J.K.; CRAWFORD, D.L. Effect of washing on the nutritional and quality characteristics of dried minced rockfish flesh. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p. 1053-1055, 1983.

Affandi, R. **Utilization of silage as food in el culture**. Vie Milieu. v. 36, n. 4, p. 317-318, 1986.

ALBERNAZ, N.D.S. **Efeito do processamento da ração sobre os valores de digestibilidade aparente dos nutrientes para Piau Verdadeiro (*Leporinus elongatus* Cuv & Val, 1864)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, p.54, 2000.

Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). **Official Methods of Analysis**. 16. ed. v. I e II, 1995.

Arvanitoyannis IS, Kassaveti A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology**. 2007; doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x.

Backoff, H.P. Some chemical changes in fish silage. **International Journal of Food Technology**, v.11, n.4, p.353-363, 1976.

Barbagallo, R.N., Spagana, G., Palmeri, R., Torriani, S. *Assessment of  $\beta$ -glycosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 292-296, 2004.

Bello, R. A., Gutiérrez, M., Ottati, M. e Martínez, A. **Estudio sobre la elaboracion de ensilado de pescado por via microbiana en Venezuela**. In:

---

<sup>1</sup> Estas e as demais referências encontram-se de acordo com as Normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFGD.

Consulta de expertos sobre tecnologia de productos pesqueros en America Latina. 2. Montevideo. Roma, FAO. p. 22, 1989.

Benjakul, S. et al. Antioxidative activity of caramelisation products and their preventive effect on lipid oxidation in fish mince. **Food Chemistry**, London, v. 90, p. 231-239, 2005.

Berenz, Z. Utilización del ensilado de residuos de pescado en pollos. Disponível em <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/aga/agap/aph134/cap2.htm>. p.11, 1994. Acesso em 25 fev. 2003.

Borrensén, T. Biotechnology, by products and aquaculture. In: BLIGH, E.G. **Seafood science and technology**. Surrey: Fishing News Books, p.278-287, 1990.

Boscolo, W.R.; Hayashi, C.; Meurer, F. et al. Digestibilidade aparente da energia e proteína das farinhas de resíduo da filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e farinha integral do camarão canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.8-13, 2004.

Cisse, A., Luquet, P., Etchian, A. Use of chemical or biological fish silage as feed for *Chrysichthys nigrodigitatus* (Bagridae). **Aquatic Living Resources**. v. 8, n. 4, p. 373-7, 1995.

Coello, N.; Brito, L.; Nonus, M. Biosynthesis of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* grown on fish silage. **Bioresource Technology**, v.73, p.221-225, 2000.

Contreras EG. **Bioquímica de pescados e derivados**. São Paulo: FUNEP, 1994.

Costa C.S., Schoffen DB, Silva LA. **Estudo do processo de silagem e da possibilidade de sua implantação industrial**. Projeto de Graduação Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2002.

Crexi V.T. **Refino de óleos de pescado provenientes do processo de silagem acida e termomecânico de farinha**. Dissertação de Mestrado em

Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

Dapkevicius, M.L.E.; Nout, R.M.J.; Rombouts, F.M. et al. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.107-114, 2000.

Dalsenter, F.D.H.; Tavares, L.B.B. A proposta ZERI: Zero Emissions Research Initiative e sua aplicabilidade. **Revista de estudos ambientais**, v.1, n.3, p.30-39, 1999.

Disney, J. G., James, D. **Fish silage production and its use**. FAO/WHO (1985). Fish. Rep., Roma, v. 230, p. 105, 1979.

Disney, G.J.; Tatterson, I.N.; Ollen, J. **Recent development in fish silage**. In: Conference on the handling processing and marketing of tropical fish, London, 1976. Proceedings. London: Tropical Products Institute, p.321-340, 1977.

Espe M, Lied E. Fish silage prepared from different cooked and uncooked raw materials: Chemical changes during storage at different temperatures **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p. 327-332, 1999.

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**. v. 49,2p.59-270, 1989.

Espíndola Filho, A. **Aproveitamento de resíduos sólidos de pescado como fertilizante marinho**. São Paulo, Dissertação (Mestrado) - universidade Machenzie, p.98. 1997.

Espíndola Filho A. **Utilização do resíduo sólido de peixe, camarão e bivalves como ingrediente de ração para aqüicultura**. São Paulo: Universidade Presbiteriana Mackenzie, 1999. 206p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Presbiteriana Mackenzie, 1999.

Fagbenro OA. Dried fermented fish silage in diets for *Oreochromis niloticus*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 46, p. 140-147, 1994.

Fagbenro, O. e Juancey, K. Water Stability, Nutrient leaching and nutritional properties of moist fermented fish silage diets. **Aquacultural Engineering**.v. 14, p.143-153. 1995a.

Fagbenro, O. e Juancey, K. Growth and protein utilization by juvenile catfish (*Clarias gariepinis*) feed dry diets containing co-dried lactic-acid-fermented fish-silage and protein feedstuffs. **Bioresource Technology**.v. 51, p.29-35, 1995b.

Fagbenro O, Jauncey K. Water stability, nutrient leaching and nutritional properties of moist fermented fish silage diets. **Aquacultural Engineering**, v. 14 p. 143-153, 1996.

Fagbenro, O. A., Juancey, K. Physical and nutritional properties of moist fermented fish silage pellets as a protein supplement for tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animal Feed Science Technology**. v. 71, p. 11-18, 1998.

Fagbenro, O.; Bello-Olusoji, O.A. Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. *Food Chemistry*, v.60, p.489-493, 1997.

Fox, C.J.; Blow, P.; Brown, J.H. et al. The effect of various processing methods on the physical and biochemical properties of shrimp head meals and their utilization by juvenile *Penaeus monodon* Fab. **Aquaculture**, v.122, p.209-226, 1994.

Furuya W.M, Hayashi C, Furuya V.R.B., Soares C. Exigência de proteína para alevino revertido de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1912-1917, 2000.

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

Gómez-Guillén MC, Turnay J, Fernández-Díaz MD, Olmo N, Lizarbe MA, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. **Food Hydrocoll.** v. 16, p. 25-34, 2002.

Gonçalves, J. F.; Santos, S.; Pereira, I. B. e Coimbra, J. The use of fish silage as an ingredient for eel fingerling nutrition. **Aquaculture**. v. 80, p. 135-46, 1989.

Gonçalves, E. G. Carneiro, D. J. Coeficientes de Digestibilidade Aparente da Proteína e Energia de Alguns Ingredientes Utilizados em Dietas para o Pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **R. Bras. Zootec.**, v.32, n.4, p.779-786, 2003.

Gonçalves, L. U.; Viegas, E.M.M.; Produção, caracterização e avaliação biológica de silagens de resíduos de camarão para tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.1021-1028, 2007.

Gryschek, S.F.; Oetterer, M.; Gallo, C.R. Characterization and frozen storage stability of minced Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.12, n.3, p.57-69, 2003.

Haard, M.F.; Kariel, N.; Herzberg, G.; Feltham, L.A.W.; Winter, K. Stabilization of protein and oil fish in silage for use as a ruminant feed supplements. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.36, n.4, p.229-241, 1985.

Hardy, R.W.; Shearer, K.P.; Stone, F.E. Wieg, D.H. Fish silage in aquaculture diets. **Journal of World Mariculture Society**, v.14, p.695-703, 1983.

Hall GM. **Silage from tropical fish**. Nottingham: University of Nottingham, (Tese de doutorado). University of Nottingham, p, 278, 1985.

Hammoumi A, Faid M, El-Yachioui M, Amarouch H. Characterization of fermented fish waste used in feeding trials with broilers. **Process Biochemistry**, v.33, n.4., p.:423-427, 1998.

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

Heras, H., Mcleod, C. A., Ackman, R. G. Atlantic dogfish silage vs. herring silage in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*): growth and sensory evaluation of fillets. **Aquaculture**. v. 125, p. 93-106, 1994.

Honczaryck A, Maeda LS. Crescimento do pirarucu, *Arapaima gigas*, utilizando dieta à base de ensilado biológico de pescado. In: Congresso Sul-Americano de Aqüicultura. 1998, Recife. Anais. Recife: **Simbraq**. p.93-100, 1998.

Hossain, M.A.; Nahar, N.; Kamal, M. Nutrient digestibility coefficients of some plant and animal proteins for rohu (*Labeo rohita*). **Aquaculture**, v.151, p.37-45, 1997.

Huidobro, A., Montero, P., Borderías, A. J. Emulsifying Properties of an Ultrafiltered Protein From Minced Fish Wash Water. **Food Chemistry**, v. 61, n. 33, p. 339, 1998.

Kirschnik, P. G.; Macedo-Viegas, E. M. Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2009.

Kompiang, I. P. Fish silage - Its prospect and future in Indonésia. **Indonésia Agricultural Research & Develop Journal**. v. 3, p. 1-12, 1981.

Jackson AJ, Kerr AK, Cowey CB. Fish silage as a dietary ingredient for salmon. I. Nutritional and storage characteristics. **Aquaculture**. v. 38,p.211-220, 1984a.

Jackson AJ, Kerr AK, Bullock AM. Fish silage as a dietary ingredient for salmon: II. Preliminary growth findings and nutritional pathology. **Aquaculture**. v. 38, p. 283-291, 1984b.

James, M.A., Iyer, K.M., Nair, M.R. **Comparative study of fish ensilage prepared by microbial fermentation and formic acid silage**. In Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish. Tropical Products Institute, London pp. 273-275,1977.

Johnson, R.J., Brown, N., Eason, P., Sumner, J. The nutritional quality of two types of fish silage for broiler chickens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, n. 11, p. 9–12, 1985.

Lall, S. P. Nutricional value of fish silage in salmonid diets. Bull. **Aquaculture Association of Canada**, v. 91, n.1, p. 63-74, 1991.

Lanier, T.C. Functional properties of *surimi*. **Food Technology**, Chicago, p. 107-124, 1986.

Lee, C. M. Surimi process technology. **Food Technology**, v.38, n. 11, p. 69-80, 1984.

Lee, C.M. Surimi manufacturing and fabrication of surimi-based products. **Food Technology**, Chicago, p. 115-124, 1986.

Lee SY, Choi JL. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 71, p. 183-207, 2001.

Lessi, E., Ximenes Carneiro, A. R. e Lupín, H. M. Obtencion de ensilado biológico de pescado. In: **Consulta de expertos sobre tecnologia de productos pesqueros em America Latina**. 2. Montevideo. Roma, FAO/WHO (1985). p.8, 1989.

Lindgren, S.; Pleje, M. Silage fermentation on fish waste products with lactic acid bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, p. 1057-67, 1983.

Lupín, H. M. Seminário sobre manipuelo, procesamiento, mercadeo y distribución de los productos de la pesca continental en America Latina: **ensilado biológico de pescado una propuesta para la utilización de residuos de la pesca continental em America Latina**. In: Comision de pesca continental para America Latina (COPESCAL). 3. Mexico, D. F., p. 12, 1983.

Macedo-Viegas, E.M.; Souza, M.L.R. Pré-processamento e conservação de peixes cultivados. In: CYRINO, J.E.P. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart, Cap. 14, p. 405-415, 2004.

MAPA. **Métodos de Análise Microbiológicos para Alimentos**. 1991/1992.

March, B.E.; Biely, J.; Tarr, H.L.A. Nutrient composition and evolution of British Columbia whole herring meal. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 20, p. 229-33, 1963.

Martin, A.M.; Bemister, P.L. **Use of peat extract in the ensiling of fisheries wastes**. Waste Management and Research, v.12, p.467-479, 1994.

Mcgoogan, B.B.; Reigh, R.C. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. **Aquaculture**, v.141, p.233-244, 1996.

Meyers, S.P.; Benjamin, G. Feeding values of crustacean waste can be improved through proper ensilage treatment. **Feedstuffs**, v.59, p.12-13, 1987.

Miranda, M.E.S. Aceitabilidade do macarrão a base de Surimi destinado a alimentação institucional. **Dissertação de tese de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC**, SC, p. 66, 1997.

Moore S, Stein W. Chhromatography determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. **Methods in Enzymology**, v.6, p. 819-831, 1963.

Morais, C. **Carne de pescado separada mecanicamente: Obtenção e utilização**. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 1994.

Morais, C.; Martins, J.F.P. Considerações sobre o aproveitamento de sobras da industrialização de pescado na elaboração de produtos alimentícios. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p.253-281, 1981.

Morales-Ulloa, D. F. **Bioconversão de Resíduos da Indústria Pesqueira**. Dissertação de Mestrado. p. 95, 1994.

Morales-Ulloa, D.F.; Oetterer, M. Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.3, p.206-214, 1995.

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**, v.17, n.3, p.252-258. 1997.

Munasinghe, D.; Ohkubo, T.; Sakai, T. The lipid peroxidation induced changes of protein in refrigerated yellowtail minced meat. **Fisheries Science**, Tokyo, v.17, p. 462-464, 2005.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. Lehninger principles of biochemistry. New York: **Worth Publication** , p. 145, 2000.

Nielsen, J. W., Dickson, J. S. and Crouse, J. D. Use of bactericin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2142, 1990.

Oetterer, M. Produção de Silagem a Partir da Biomassa Residual de Pescado. **Revista Alimentos e Nutrição**. São Paulo. V.5, p.119-134. 1993/94.

Oetterer, M.; Siqueira, A.A.Z.C.; Gryscek, S.B. Tecnologias emergentes para processamento do pescado cultivado. In: Cyrino, J.E.P. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: Tecart, p. 481-500, 2004.

Oliveira, A.M.B.M.S. **Substituição de fontes protéicas de origem animal por fontes protéicas de origem vegetal em rações para o “Black bass” *Micropterus salmoides***. Piracicaba, 2003. 103p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Oliveira-Filho, P.R.C. **Elaboração de embutido cozido tipo salsicha com carne mecanicamente separada de de resíduos de filetagem de tilápias do Nilo**. 115f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

Ordóñez, J.A. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed, v.2 , 2005.

Ottati, M. G.; Bello, R. A. Ensilado microbiano de pescado en America Latina. I. Valor nutritivo del producto en dietas para cerdos. In: Consulta De Expertos Sobre Tecnologia De Productos Pesqueros En America Latina. 2. Montevideo. Roma, **FAO/WHO** (1985). p.22, 1989.

Ottati, M.; Gutierrez, M.; Bello, R. Estudio sobre la elaboracion de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de especies subutilizadas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 40, p. 408-424, 1990.

Parin MA, Zugarramurdi A. Investment and production costs analysis in food processing plants. **International Journal of Production Economics**, v. 34, p. 83-89, 1994.

Park, J.W.; Lin, T.M.J. *Surimi*: manufacturing and evaluation. In: PARK, J.W. **Surimi and surimi seafood**. 2.ed. London: Taylor and Francis Group, CRC, Cap. 2, p.33-106, 2005.

Peixoto, M.R.; Sousa, C.L.; Mota, E.S. Utilização da pescada (*Macrodon ancylodon*) de baixo valor comercial na elaboração de moldado sabor camarão. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 18, n.2, p. 151-162, 2000.

Portella R. **Otimização processo de refino e sua relação com a qualidade do óleo de pescado**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

Raa, J.; Gildberg, A. Fish Silage; a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 16, n. 4, p. 383-419, 1982.

Raa, M.E.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*, v.49, p.259-270, 1989.

Raccach, M.; Baker, R.C. Microbial properties of mechanical deboned fish flesh. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, p. 1675-1677, 1978.

Ramos, O. V.; Dorado, M. Del P. e Caro, E. O. Ensayo sobre la alimentacion de La cachama negra (*Colossoma macropomum*) con pescado en acidos organico e inorganico (Fish silage). **Boletin Cientifico INPA**, v. 2, p.46-61, 1994.

Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G., and Cocolin, L. Ecology and characterization by molecular methods of Staphylococcus species isolated from fresh sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 277-284, 2005.

Rivera, M.J.G.N. Utilização de resíduos da indústria pesqueira de atum para a elaboração de patê como um produto rentável. **Dissertação de tese de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC**, SC, p.97, 1994.

Rodriguez, V. G., Fedor, A. B., Contreras, P. R., Flores, G. R., Navarro, G.G., Ezquerro, M. A. e Pérez, C.L. **Definición tecnológica para a elaboración de hidrolizado de proteína a partir de la fauna acompañante del camaron de La plataforma cubana**. In: Consulta de expertos sobre tecnología de productos pesqueros en America Latina. 2. Montevideo. Roma, FAO/WHO (1985). p.12, 1989.

Rodrigues, A.M.P. Digestibility studies in fish: a review. **Instituto de Zoologia Dr. Augusto Nobre, Série Monografias**, n.6, p.29, 1994.

Rodríguez-Herrera, J. et al. Possible role for cryostabilizers in preventing protein and lipid alterations in frozen-stored minced muscle of Atlantic mackerel. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 3324-3333, 2006.

Rustad T. Utilization of marine by-products. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v.2, p.1-9, 2003.

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

Samuels, W.A.; Fontenot, J.P.; Allen, V.G.; Abazinge, M.D.A. Seafood processing wastes ensiled with straw: utilization and intake by sheep. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4983-4992, 1991.

Santo, M. L. P. E., Carbonea, N., Ramon, T., Gonzalez, P. N. M., Rodrigues, L. G. G., Souza, J. Atividade antimicrobiana do *Lactobacillus sakei* na fermentação do bonitode-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*). **Vetor** 16(1/2): 25-36, 2006.

Sgarbieri, V.C. **Proteínas em Alimentos Protéicos: propriedades, degradações e modificações**. São Paulo: Livraria Varela. p. 355-386, 1996.

Shirai K, Guerreiro I, Huerta S, Saucedo G, Castillo A, Obdulia-Gonzalez R, Hall GM. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 446-452, 2001.

Simões, D.R.S. et al. Hambúrgueres formulados com base protéica de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n. 4, p.414-420, out./dez., 1998.

Souza, M.L.R. et al. Defumação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inteira eviscerada e filé: aspectos referentes às características organolépticas, composição centesimal e perdas ocorridas no processamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.1, p.27-36, 2004.

Souza, R.R.P. **Digestibilidade aparente da proteína de dietas para o híbrido de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1989. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1989.

Stone FE, Hardy RW. Nutritional value acid stabilized silage and liquefied fish protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, p. 797-803, 1986.

Stone FE, Hardy RW, Shearer KD, Scott TM. Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v. 76, p. 109-118, 1989.

Stori, F.T. Avaliação dos resíduos da industrialização do pescado em Itajaí e Navegantes (SC), como subsídio à implementação de um sistema gerencial de bolsa de resíduos. **Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, SC**, p.145, 2000.

Tejada M. **Tratamiento de residuos sólidos de la industria transformadora del pescado**. Alimentación, Equipos y Tecnología, p. 123-128, 1992.

Tenuta-Filho, A; Jesus, R.S. Aspectos da utilização de carne mecanicamente separada de pescado como matéria-prima industrial. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v.37, n.2, p. 59-64, jul./dez., 2003.

Tatterson, I. N. e Windsor, M. L. Fish silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 25, p. 369-379, 1974.

Tocher, D.R.; Mourente, G.; Sargent, J.R. The use of silages prepared from fish neural tissues as enrichers for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* in the nutrition of larval marine fish. **Aquaculture**, v.148, p.213-231, 1997.

Viana, M.T.; Guzman, J.M.; Escobar, R. Effect of heated and unheated fish silage as a protein source in diets for abalone *Haliotis fulgens*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.30, n.4, p.481-489, 1999.

Viana, M.T.; Lopez, L.M.; Garcia-Esquivel, Z.; Mendez, E. The use of silage made from fish and abalone viscera as an ingredient in abalone feed. **Aquaculture**, v.140, p.87-98, 1996.

Valério, A. C. R. **Elaboração de Silagem Enzimática de Pescado como Alternativa ao Processo Tradicional**. Dissertação de Mestrado. p.87, 1994.

Van Wyk, H. J., Heyderych, C. M. S. The production of naturally fermented fish silage using various Lactobacilli and different carbohydrate sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 103-109, 1985.

Vidotti RM, Carneiro DJ, Macedo-Viegas EM. Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Journal World Aquaculture Society**, v. 33, p. 57-62, 2002.

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**, v. 105, p.199-204, 2003.

Wignall, J., Tatterson, I. Fish silage. **Process. Biochemistry**, Jan/Fev, 1977.

Willes, J.L.; Green, B.W.; Bryant, R. Texture profile analysis and composition of a minced catfish product. **Journal of Texture Studies**, Westport, v.35, p.325-337, 2004.

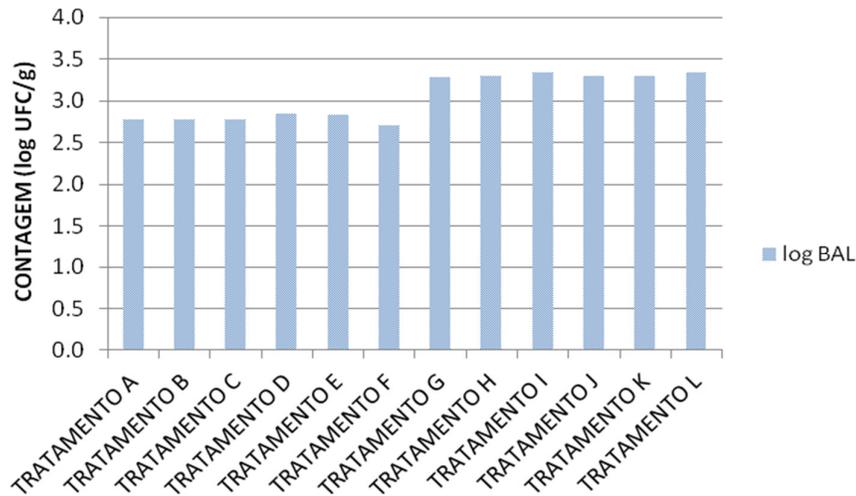
Windsor, M., Barlow, S. **Introducion a los Subproductos de Pesqueria**. Espanã, Acríbia. p.204, 1984.

Ximenes Carneiro, A. R. **Elaboração e uso de ensilado biológico de pescado na alimentação de alevinos de tambaqui, *Colossoma macropomum*** (Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado. p. 81, 1991.

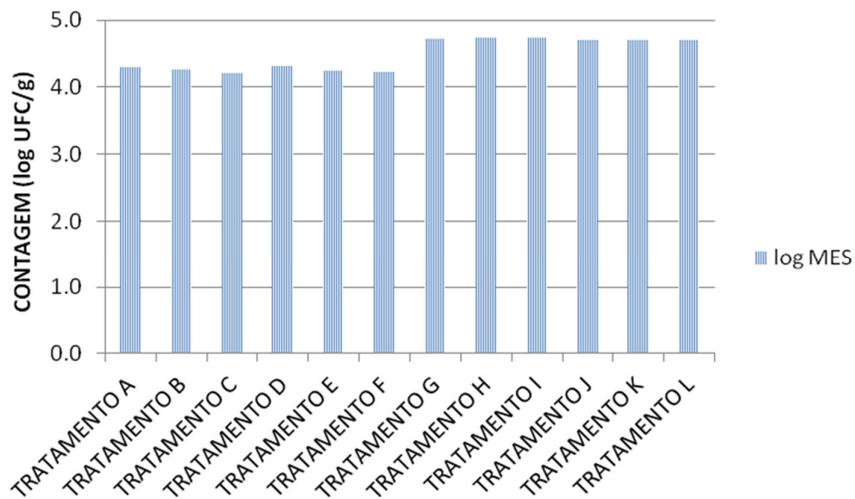
Zahar, M.; Benkerroum, N.; Guerouali, A.; Laraki, Y.; El yakoubi, K. Effect of temperature, anaerobiosis, stirring and salt addition on natural fermentation silage of sardine and sardine wastes in sugarcane molasses. **Bioresource Technology**, v.82, p.171-176, 2002.

## ANEXOS

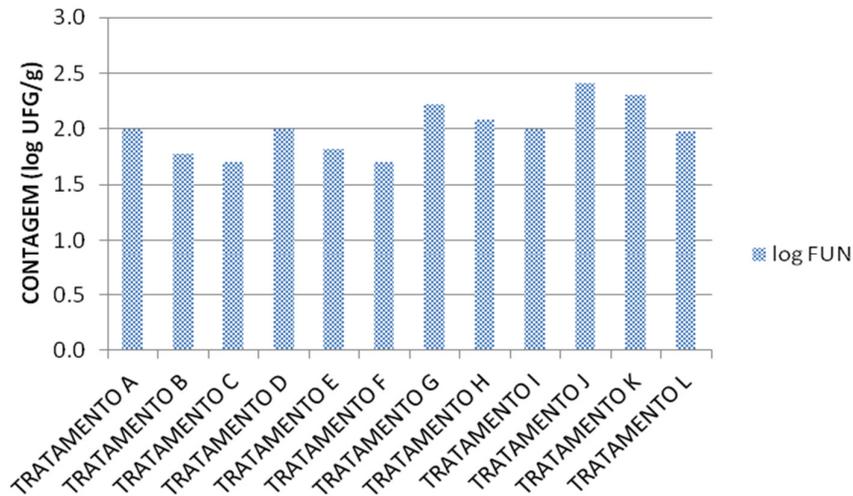
### Anexo A – Contagem de microrganismos (log UFC/g)



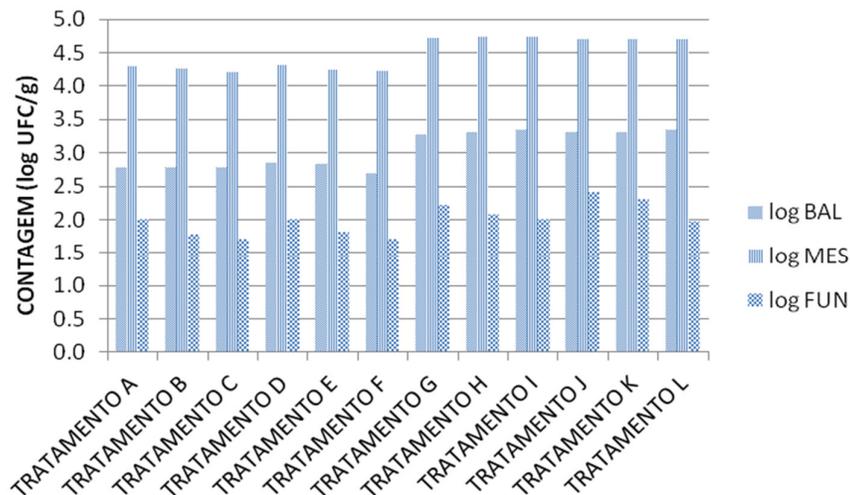
**Anexo A1.** Contagem de bactérias lácticas (BAL) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).



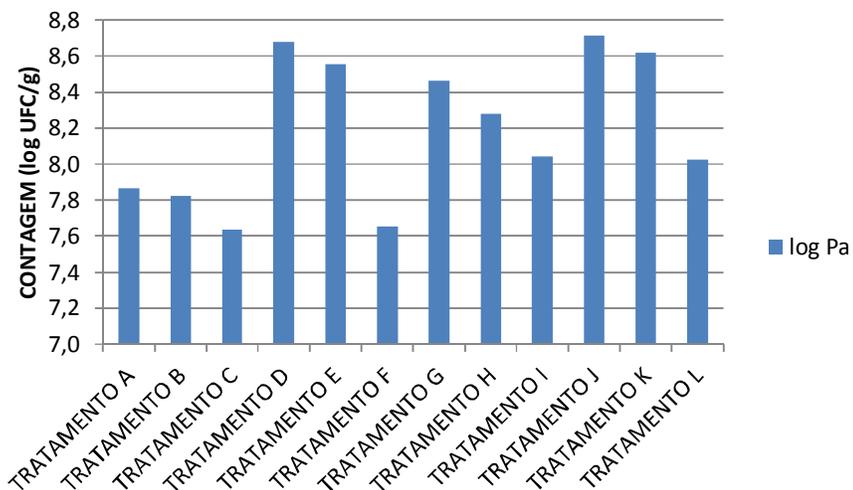
**Anexo A2.** Contagem de microrganismos mesófilos totais (MES) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).



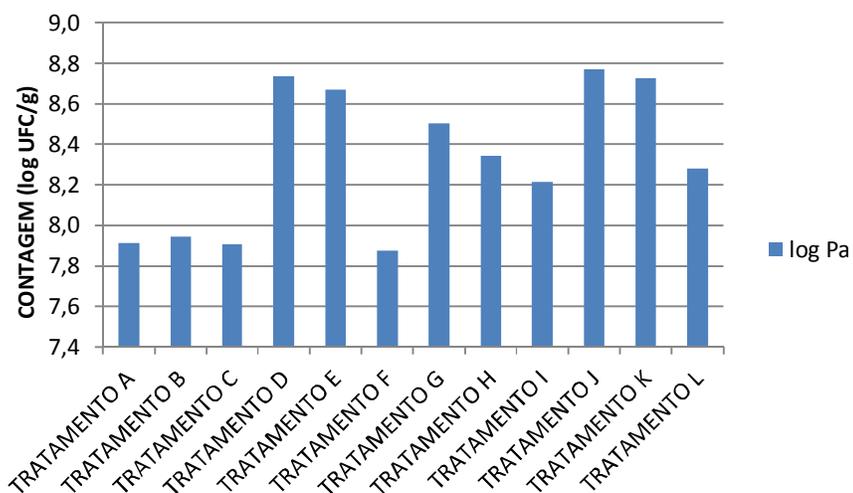
**Anexo A3.** Contagem de fungos (FUN) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).



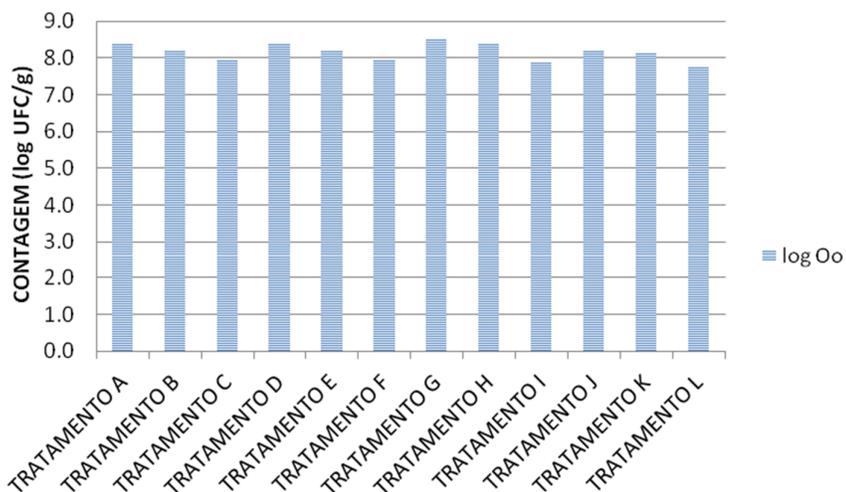
**Anexo A4.** Comparação entre as contagens de bactérias lácticas (BAL), microrganismos mesófilos totais (MES) e fungos (FUN) em log UFC/g antes da inoculação em diferentes meios pasteurizados (A-L).



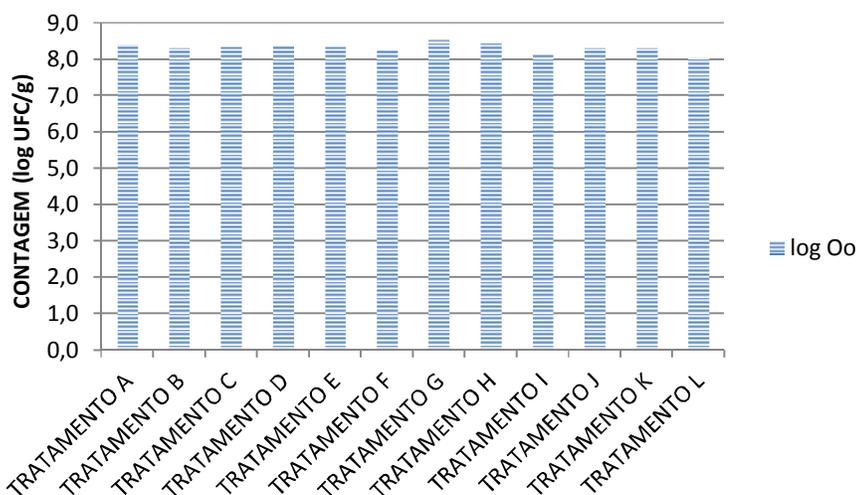
**Anexo A5.** Contagem de bactérias lácticas *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa) em log UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L)



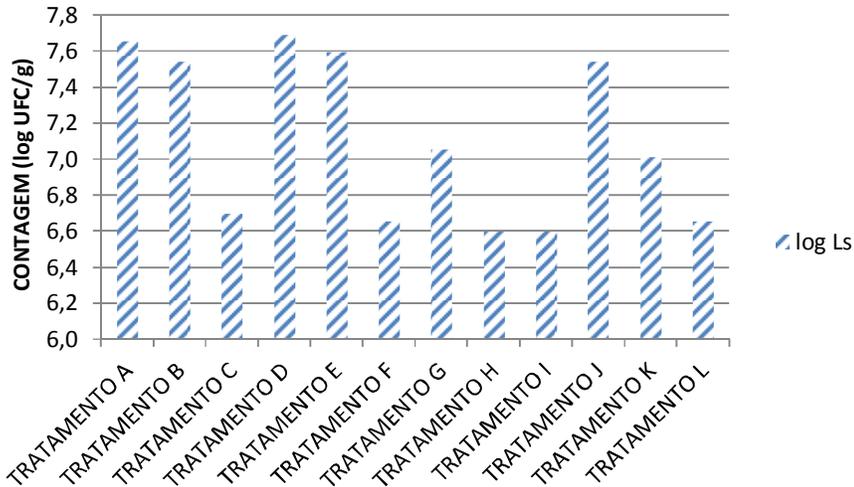
**Anexo A6.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



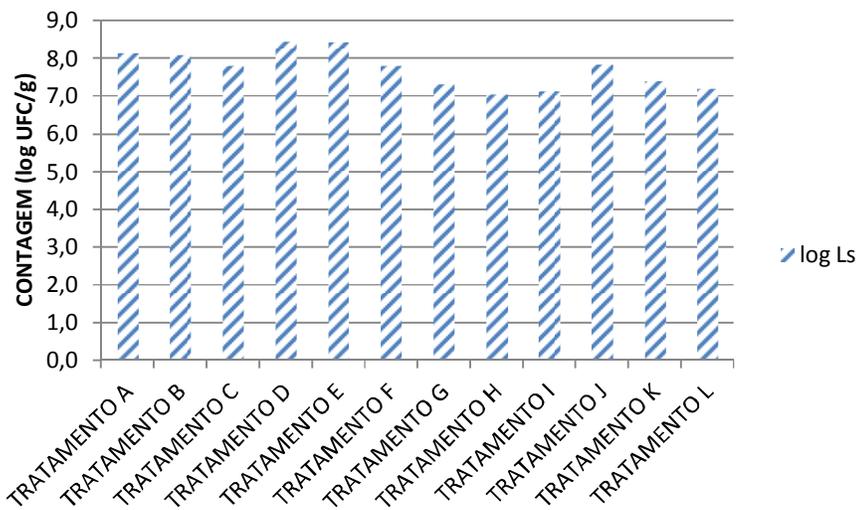
**Anexo A7.** Contagem de bactérias lácticas *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo) em log UFC/g após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L).



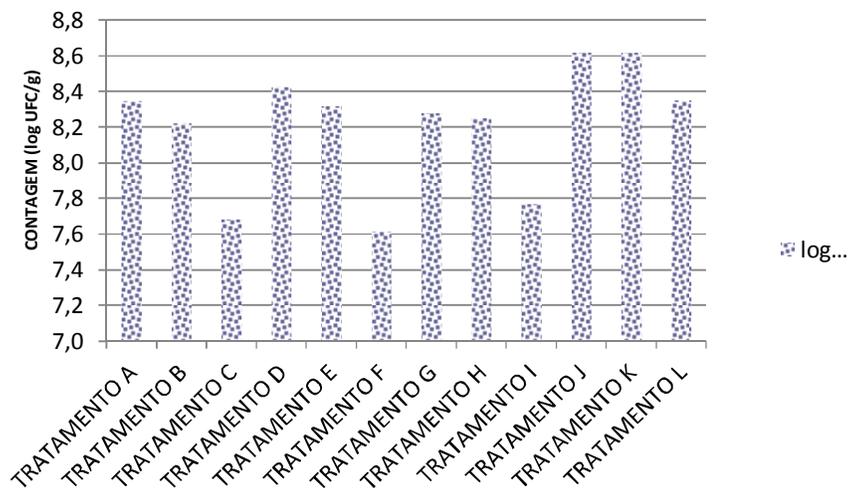
**Anexo A8.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



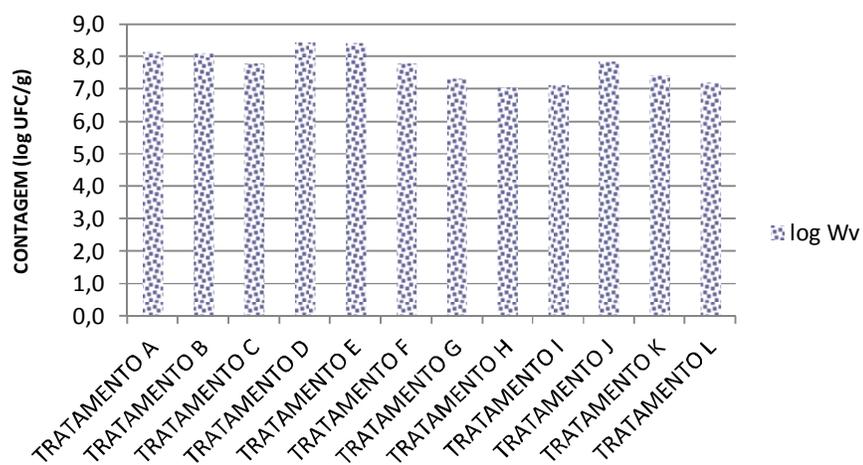
**Anexo A9.** Contagem de bactérias lácticas *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls) em (A) (UFC/g) e (B) (log UFC/g) após 4 dias de cultivo em diferentes meios pasteurizados (A-L).



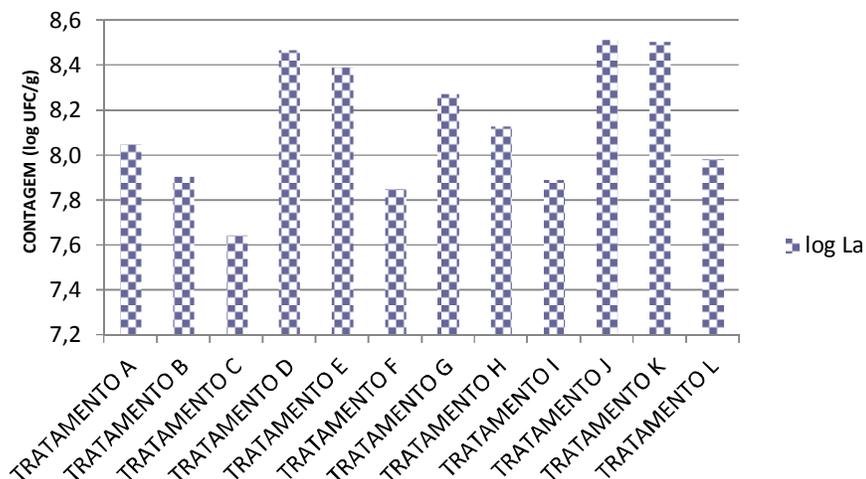
**Anexo A10.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



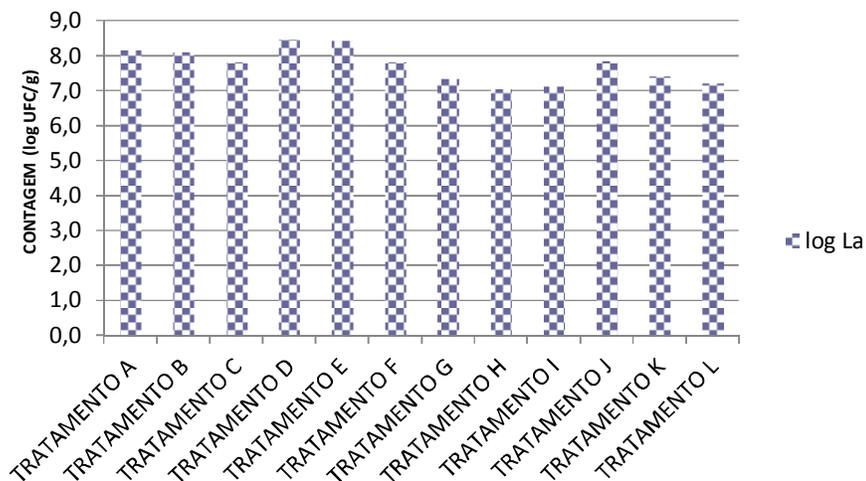
**Anexo A11.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



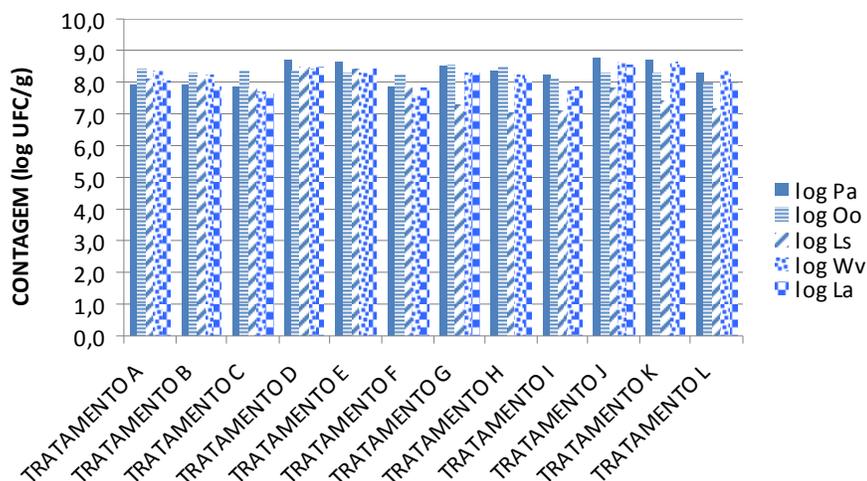
**Anexo A12.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



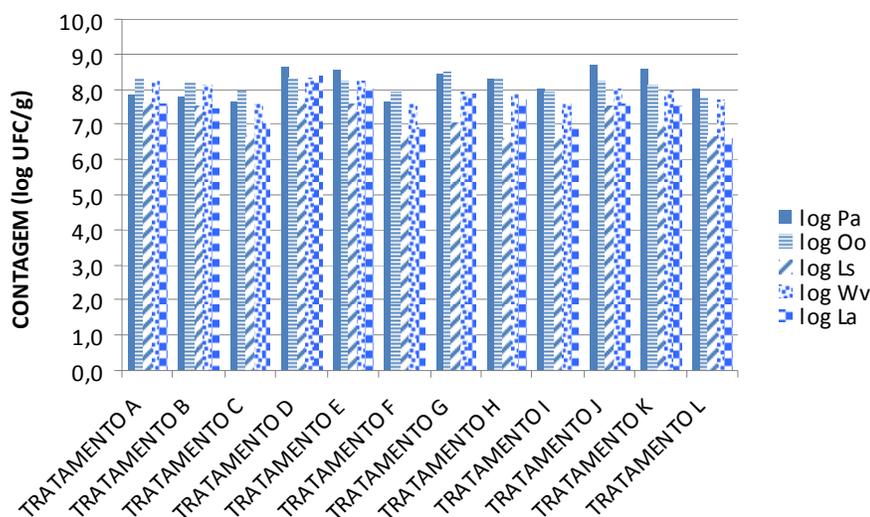
**Anexo A13.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



**Anexo A14.** Contagem de microrganismos aeróbios totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



**Anexo A15.** Comparação entre as contagens de bactérias lácticas em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).



**Anexo A16.** Comparação entre as contagens de microrganismos mesófilos totais em log UFC/g após 4 dias de cultivo com *Pediococcus acidilactici* NRRL B-14958 (Pa), *Oneococcus oeni* NRRL B-3472 (Oo), *Lactobacillus sakei* NRRL B-1917 (Ls), *Weissella viridescens* NRRL B-1951 (Wv) ou *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-23431 (La) em diferentes meios pasteurizados (A-L).

## Anexo B - Cultivos



**Anexo B1.** Meios de cultivo antes da inoculação



**Anexo B2.** Meios de cultivo após 4 dias da inoculação com *Weissella viridescens* NRRL B-1951