

MOISÉS SENA PESSOA

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA
SILAGEM ÁCIDA DE PESCADO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau em Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Eduardo Robson Duarte

Montes Claros

2012

Pessoa, Moisés Sena.

P475c Características físico-químicas e microbiológicas da silagem ácida de
2012 pescado / Moisés Sena Pessoa. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2012.

46f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Ronald Kennedy Luz, Daniel Emygdio de Faria Filho, Antônio Cléber da Silva Camargo, Eduardo Robson Duarte.

Inclui bibliografia: f. 39-46

1. Acidificação. 2. Bactérias. 3. *Oreochromis niloticus*. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 579

MOISÉS SENA PESSOA

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA
SILAGEM ÁCIDA DE PESCADO**

Prof°. Ronald Kennedy Luz
(Escola de Veterinária - UFMG)

Prof°. Daniel Emygdio de Faria Filho
(ICA - UFMG)

Prof°. Antônio Cléber da Silva Camargo
(Coorientador / ICA - UFMG)

Prof°. Eduardo Robson Duarte
(Orientador / ICA - UFMG)

Aprovada em 6 de fevereiro de 2012.

*Aos meus pais, à minha companheira e aos amigos, pela torcida,
que nos obrigam a conquistar o sucesso em tudo aquilo que
nos propomos a fazer, com amor.*

DEDICAÇÃO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a saúde e a paz durante esse período.

À Flávia, o grande apoio, o companheirismo e o amor.

Aos meus pais, a saudade, o carinho e a compreensão.

À UFMG, a estrutura e a acolhida durante esses longos anos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte, a orientação, a paciência e a compreensão durante a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Antônio Cléber da Silva Camargo, a amizade, a orientação e a oportunidade dada durante esses 7 anos para trabalhar com a área com a qual mais tenho afinidade.

Ao Prof. Daniel Emygdio de Faria Filho, a amizade ao longo desse período, a coorientação e as sugestões.

Ao Prof. Ronald Kennedy Luz, a contribuição na melhora desta pesquisa como membro da Banca Examinadora.

A todos os professores, que de alguma forma contribuíram em alguma etapa deste trabalho.

Aos funcionários do ICA, que quando foram necessários colaboraram com esta pesquisa.

Aos amigos, o apoio e o carinho, pelo simples fato de serem meus amigos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Silagens ácidas de pescado acrescidas de ácido acético S1 e de ácido láctico (S2)..... | 27 |
| FIGURA 2 – Fotomicrografia de esfregaços da silagem ácida de pescado, acrescida de ácido acético, com sete dias de armazenamento, após a coloração de Gram, objetiva de 100X..... | 28 |
| FIGURA 3 – Fotomicrografia de esfregaços da silagem de pescado, acrescida de ácido láctico, com sete dias de armazenamento, após a coloração de Gram, objetiva de 100X | 28 |
| FIGURA 4 –População de <i>Staphylococcus</i> spp. em função tempo de armazenamento da silagem acética | 33 |
| FIGURA 5 – População de <i>Staphylococcus</i> spp. em função tempo de armazenamento da silagem láctica..... | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - Valores de pH das silagens de pescado acidificadas com ácido lático ou acético, em diferentes tempos de armazenamento..... | 25 |
| TABELA 2 - Médias de unidades formadoras de colônias de fungos por mL de silagens de pescado com ácido lático ou acético, em diferentes tempos de armazenamento..... | 30 |
| TABELA 3 - Taxa de positividade e quantificação de colônias de <i>Staphylococcus</i> spp., em silagens de pescado acidificadas com ácido lático ou acético, em diferentes tempos de armazenamento..... | 32 |
| TABELA 4 - Composições bromatológicas de duas silagens de pescado, com 28 dias de armazenamento e da matéria-prima constituída de resíduos de tilápias..... | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--|----|
| ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária..... | 32 |
| ANOVA – Análise de variância..... | 23 |
| AOAC – Association of Official Agricultural Chemists..... | 23 |
| BOD – <i>Biochemical Oxygen Demand</i> | 22 |
| Ca – Cálcio..... | 23 |
| CV – Coeficiente de variação..... | 24 |
| EE – Extrato etéreo..... | 23 |
| g – Gramas..... | 20 |
| FAO – <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> | 13 |
| FIG – Figura..... | 26 |
| LAC ⁺ – Bactérias produtoras da enzima lactase..... | 29 |
| LAC ⁻ – Bactérias não produtoras da enzima lactase..... | 29 |
| Log – Logaritmo..... | 23 |
| ml – mililitro..... | 29 |
| MN – Matéria natural..... | 35 |
| MP – Matéria prima..... | 35 |
| MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura..... | 12 |
| MRS – Man, Rogosa and Sharpe..... | 23 |
| MS – Matéria seca..... | 23 |
| ONU – Organizações das Nações Unidas..... | 12 |
| P – Fósforo..... | 23 |
| PB – Proteína bruta..... | 23 |
| pH – Potencial hidrogeniônico..... | 22 |
| p/v – Peso por volume..... | 17 |
| R ² – Coeficiente de determinação..... | 33 |
| S1 – Silagem acética..... | 21 |
| S2 – Silagem láctica..... | 21 |
| SAEG® – Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas..... | 24 |
| T0 – Matéria prima..... | 21 |

| | |
|---|----|
| T1 – Um dia de armazenamento..... | 21 |
| T7 – Sete dias de armazenamento..... | 21 |
| T14 – Quatorze dias de armazenamento..... | 21 |
| T21 – Vinte e um dias de armazenamento..... | 21 |
| T28 – Vinte e oito dias de armazenamento..... | 21 |
| TAB – Tabela..... | 24 |
| UM – Umidade..... | 35 |
| UFC – Unidade formadora de colônia..... | 29 |
| UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais..... | 21 |
| UNIMONTES – Universidade Estadual de Montes Claros..... | 21 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 13 |
| 2.1 Panorama da aquicultura | 13 |
| 2.2 Tilápia | 14 |
| 2.3 Silagem de Pescado | 15 |
| 2.4 Micro-organismos envolvidos no processo de ensilagem.. | 17 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 Local do experimento | 21 |
| 3.2 Processamento | 21 |
| 3.3 Análises físico-químicas e microbiológicas | 22 |
| 3.4 Análise bromatológica | 23 |
| 3.5 Análises estatísticas | 23 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 4.1 Mensuração do pH | 24 |
| 4.2 Avaliação macroscópica | 26 |
| 4.3 Exame direto para detecção de bactérias e de leveduras... | 27 |
| 4.4 Cultivo, quantificação e identificação de micro-organismos | 29 |
| 4.5 Análise bromatológica | 35 |
| 5 CONCLUSÃO | 38 |
| REFERÊNCIAS | 39 |

RESUMO

Nesta pesquisa, objetivou-se avaliar as características físico-químicas e microbiológicas das silagens ácidas de peixes inteiros submetidos a dois processos de acidificação, em diferentes períodos de armazenamento. A primeira silagem foi produzida com adição de ácido acético (5% da biomassa) (S1) e a segunda com acréscimo de ácido láctico (5% da biomassa) (S2). Os materiais foram armazenados em estufa BOD, a 37°C por até 28 dias. As análises foram realizadas para a matéria-prima, nos períodos de um, sete, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. Foram avaliados o pH, a liquefação e a produção de óleo para cada período. Realizou-se análise microscópica após a coloração de Gram das duas silagens, bem como o cultivo, a quantificação e o isolamento de Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., fungos filamentosos e leveduras. Com 28 dias de acidificação, foram realizadas análises bromatológicas de ambas as silagens, assim como da matéria-prima. O pH médio da silagem com ácido láctico foi significativamente menor ao observado para a silagem produzida com ácido acético. Em uma semana, as silagens se liquefizeram e ocorreu a produção de óleo. Enterobactérias foram detectadas apenas para amostras da matéria-prima. Houve desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras até sete dias para ambas silagens. A análise de regressão estimou que o tempo ótimo para estabilização da silagem láctica é de 7,6 dias, mostrando-se eficiente para a redução da população de *Staphylococcus* spp.. Ambas as silagens apresentaram alto teor de proteína, podendo ser uma boa alternativa para a alimentação de não ruminantes. Esta pesquisa representa o primeiro estudo no Brasil que avalia a produção da silagem de pescado, acrescida de ácido láctico e os resultados indicam melhor queda de pH e redução mais rápida da população de *Staphylococcus* spp., quando comparada à silagem acrescida de ácido acético.

Palavras-chave: Acidificação. Bactérias. Fungos. Nutrição. *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the physical-chemical and microbiological characteristics of acid silage of whole fish submitted to two processes of acidification in different periods of storage. The first silage was produced with acetic acid (5% of the biomass) (S1) and the second addition of lactic acid (5% of the biomass) (S2). The materials were stored in an environmental chamber at 37 ° C for 28 days. The analyses were performed for the raw material and the periods of one, seven, 14, 21 and 28 days storage. The pH, the melting and production of oil were evaluated for each period. Microscopic analysis was performed after two Gram staining of silage, and the cultivation, quantification and isolation of Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., Filamentous fungi and yeasts. With 28 days of acidification were carried out chemical analyzes of both silages, as well as the raw material. The average pH of the silage with lactic acid was significantly lower than that observed for the silage made with acetic acid. In one week, the silage was melted and oil production. Enterobacteriaceae were only detected for samples of the raw material. There was development of filamentous fungi and yeasts up to seven days for both silages. Regression analysis estimated that the optimal time for stabilization of silage lactic acid is 7.6 days, proving to be efficient for the reduction of *Staphylococcus* spp. population. Both silages had high protein content, and may be a good alternative for feeding non-ruminants. This work represents the first study in Brazil that evaluates the production of fish silage increased by lactic acid and the results indicate better pH drop and faster reduction of *Staphylococcus* spp., when compared to fish silage increased by acetic acid.

Keywords: Acidification. Bacteria. Fungi. Nutrition. *Oreochromis niloticus*.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a aquicultura e a pesca são consideradas atividades estratégicas para a segurança alimentar sustentável do planeta, pois são capazes de prover alimento proteico de qualidade e gerar trabalho em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (ARANA, 1999).

A produção brasileira de pescado tem demonstrado aumentos significativos nos últimos anos, e em 2009 foi registrada a produção de 415.649 toneladas. Entretanto, a produção da pesca extrativa marítima e continental para esse mesmo período correspondeu a 825.164 toneladas (MPA, 2010).

Com o evidente aumento na produção de pescado, a utilização de alimentos de boa qualidade e baixo custo é imprescindível para o desenvolvimento dessa atividade. Entre diferentes fontes alternativas para alimentos destinados à criação de peixes, a silagem de pescado apresenta elevada qualidade nutricional e alta potencialidade para a produção animal sustentável.

A silagem de peixes é obtida com a adição de ácidos ou por fermentação microbiana do pescado inteiro ou de resíduos do beneficiamento. A aparência dessa é líquida e é imprópria para o consumo humano. Diferentes espécies de pescado podem ser utilizadas para a produção da silagem de peixe e, dentre essas, a *Oreochromis niloticus*, conhecida como tilápia nilótica tem sido a que apresenta maior potencial (MAIA *et al.*, 2000; UCCI, 2004).

Segundo Oliveira (2005), a composição centesimal da silagem de pescado adicionada de ácido fórmico a 3% apresentou 42,1% de umidade, 48,3% de proteína, 19,3% de extrato etéreo e 29,4% de cinzas, demonstrando ser uma alternativa viável para utilização na alimentação animal, considerando-se o perfil bromatológico, microbiológico e de estabilidade.

Recentes pesquisas evidenciam as características favoráveis à utilização dessa silagem, como a boa qualidade, o baixo custo e a alta

digestibilidade (SEIBEL; SOUZA-SOARES, 2003; BORGHESI, 2004; CARVALHO *et al.*, 2006; VIDOTTI; GONÇALVES, 2006; BORGHESI *et al.*, 2008). Contudo há poucos relatos sobre o perfil microbiológico da silagem ácida de pescado.

Pesquisas sobre a população microbiana envolvida no processo de armazenamento das silagens de pescado permitirão maior conhecimento sobre a presença de micro-organismos com potencial biotecnológico para serem utilizados como inoculantes. A avaliação microbiana do produto final permitirá, ainda, alternativas de controle de agentes patogênicos ou deteriorantes. Outro fator relevante e pouco respaldado na literatura científica é a composição bromatológica desse alimento. Análises das características nutricionais da silagem ácida de pescado permitirão melhor inferência desse alimento em formulações de dietas na aquicultura.

Dessa forma, objetivou-se, com a presente pesquisa, avaliar as características físico-químicas e microbiológicas da silagem ácida de pescado submetida a dois processos de acidificação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Panorama da aquicultura

A aquicultura é um setor de produção crescente, ativo e importante para a alimentação rica em proteínas. A produção mundial de pescado da aquicultura, incluindo peixes de barbatanas, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos para o consumo humano, atingiu 52,5 milhões de toneladas em 2008 (FAO, 2010).

Na década de 1980, a aquicultura foi à única atividade relacionada a produção de alimentos que apresentou taxa de desenvolvimento superior a 10% ao ano e, por isso, vem constituindo importante fonte de proteína animal. Esse desenvolvimento, associado ao crescimento de práticas de cultivo de pescado cada vez mais intensas, gerou maior demanda por fontes de alimentos de elevada qualidade para a formulação de dietas de alto valor

nutricional, economicamente viáveis e ambientalmente apropriadas (CASTAGNOLLI, 1995; ESPE; LIED, 1999).

A produção mundial pesqueira e aquícola atingiram a marca de 155,8 milhões de toneladas (t), em 2007 e 159,2 milhões, em 2008. Os maiores países produtores foram: a China, com 57,8 milhões t; a Indonésia, com 8,8 milhões t, e a Índia, com 7,6 milhões t. O Brasil contribui com apenas 0,69%, o que representou uma produção de 1,07 milhão de toneladas em 2007 e 0,73%, referente a 1,17 milhão de toneladas em 2008, para o total da produção mundial (MPA, 2010).

Essa atividade se destaca no Brasil como atividade zootécnica de importância econômica para o pequeno e médio produtor, tornando-se favorável ao aproveitamento de áreas improdutivas, elevando a potencialidade e a produtividade das propriedades rurais. A produção de pescado tem se intensificado nos últimos anos, tendo a tilápia nilótica como uma das principais espécies cultivadas (HIRSCH *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

2.2 Tilápia

A espécie *Oreochromis niloticus*, pertencente à família dos ciclídeos, é proveniente da bacia do rio Nilo, no leste da África e encontra-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, foi inserida, na década de 1970, no nordeste, difundindo-se para todo o país (CARVALHO, 2006). Atualmente, essa espécie corresponde a um dos peixes mais produzidos no mundo, com produção estimada em 2,4 milhões de toneladas em 2008 (FAO, 2010).

A tilápia é uma espécie tropical, cuja temperatura ideal para o crescimento varia entre 25 a 30°C, sendo que abaixo de 15°C apresenta desenvolvimento comprometido, não resistindo a temperaturas de aproximadamente 9°C (CYRINO; CONTE, 2006).

São reconhecidas mais de 50 espécies de tilápias, sendo *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* os principais gêneros de importância comercial. Entre esses, o de maior importância na aquicultura mundial é *Oreochromis* spp.

(KUBITZA, 2000). A tilápia é a espécie de pescado de água doce mais produzida no Brasil (MPA, 2010). Possui hábito alimentar onívoro e tem se destacado pela alta capacidade de digestão e uso da energia e proteína dos alimentos de origens vegetal e animal, superando a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e o bagre africano (*Clarias gariepinus*) (CYRINO; CONTE, 2006).

A tilápia está entre as espécies de peixes ósseos mais comercializadas, tornando-se uma fonte de proteína em todo o mundo, principalmente por causa da sua adaptabilidade, sob uma vasta gama de condições ambientais e de excelente crescimento sobre uma variedade de dietas formuladas e naturais (KUMAR *et al.*, 2012).

Essa espécie apresenta carne saborosa, com baixo teor de gordura (0,9 g.100g⁻¹ de carne) e de calorias (117 kcal.100g⁻¹ de carne), alto rendimento de filé, chegando a 35 e 40% e ausência de espinhos em forma de “Y” (mioceptos), o que a torna extremamente apropriada para a industrialização, além de possuir alto valor comercial (CYRINO; CONTE, 2006).

As tilápias podem ser produzidas em ambientes abertos ou fechados, com água doce, salobra ou marinha e com diferentes níveis tecnológicos. A criação de tilápias e o número de pesquisas desempenhadas com a espécie vêm se intensificando a cada ano (FURUYA *et al.*, 2010).

2.3 Silagem de pescado

A silagem de resíduos de pescado pode ser elaborada quimicamente, com acidificação direta de ácidos orgânicos e/ou minerais (RIVERO; VIANA, 1996). Entretanto pode ser ainda produzida biologicamente, com acidificação realizada por micro-organismos produtores de ácido láctico (HASSAN; HEATH, 1987; VIZCARRA-MAGAÑA *et al.*, 1999; ZAHAR *et al.*, 2002) ou pela junção desses métodos (MORALES-ULLOA; OETTERER, 1995).

Em 1920, a silagem ácida foi desenvolvida, usando ácido clorídrico e sulfúrico para a conservação de forragens. A elaboração de silagem de pescado é simples, não demandando equipamentos e procedimentos onerosos, como os empregados na produção de farinha de peixe. Por isso,

poderia ser uma alternativa para a reutilização do resíduo do processamento da tilápia (TATTERSON; WINDSOR, 1974; DISNEY *et al.*, 1977; RAA; GILBERG, 1982; JACKSON *et al.*, 1984; OTTATI *et al.*, 1990; MARTIN; BEMISTER, 1994; COELLO *et al.*, 2000).

Há autores que acreditam que a similaridade dessa fonte de aminoácidos com a composição proteica da carne de peixe proporciona, a essa silagem, grande potencial como fonte de alimento para a aquicultura, respaldando o baixo custo desse alimento, principalmente quando comparado ao da farinha de peixe (DISNEY *et al.*, 1977; HUSSAIN; OFFER, 1987; FAGBENRO *et al.*, 1994).

Na dieta do pirarucu (*Arapaima gigas*), peixe carnívoro de extrema importância na região amazônica, Honczaryk e Maeda (1998) avaliaram dietas contendo silagem biológica de pescado e observaram que os peixes apresentaram maior nível de ingestão. A tecnologia aplicada na elaboração dessa silagem mostrou-se adequada para a obtenção de um produto com elevado teor de proteínas para ser utilizado na elaboração de rações para o pirarucu, podendo ser preparado artesanalmente, sem equipamentos sofisticados e sem mão de obra especializada.

Na criação de salmão (*Salmo salar*), é indispensável a pesquisa de dietas que promovam o rápido crescimento, que favoreçam a sanidade dos peixes, que resultem em produtos de qualidade e que tenham baixo custo. Alguns autores, avaliando o uso da silagem de pescado na alimentação dessa espécie, concluíram que essa fonte, apesar de não promover melhor desempenho, promoveu redução no desempenho, no entanto pôde ser obtida a um baixo custo (ESPE *et al.*, 1992; HERAS *et al.*, 1994).

Fagbenro *et al.* (1994; 1995) estudaram o valor nutricional de dietas contendo silagem microbiana de pescado, parcialmente desidratadas pela adição de farinha de soja, subproduto de aves ou farinha de ossos e carnes. Esses autores constataram que não houve diferenças significativas nos parâmetros de desempenho e de utilização da proteína, quando comparadas à dieta composta por silagem e farinha de soja. Indicaram que essas silagens podem ser utilizadas na alimentação de *Oreochromis niloticus* e *Claras*

garipepinus (bagre africano), sem que o desempenho, a utilização de proteínas e a composição da carcaça fossem alterados.

Vidotti *et al.* (2002) realizaram a caracterização da silagem ácida e fermentada, determinaram o coeficiente de digestibilidade aparente de proteína bruta para Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Esses autores observaram que ambas as silagens apresentam-se como boa alternativa para a alimentação dessa espécie.

A silagem de pescado pode ser usada como alimento para peixes carnívoros e onívoros, fornecendo proteínas de boa qualidade e alta digestibilidade. A silagem produzida com a mistura do ácido fórmico e propiônico, na proporção de 1:1 e adição de 1,5 a 3,0% (p/v) em relação à massa, é recomendada; o produto é estável e livre de micro-organismos patogênicos (GODDARD; AL-YAHYAI, 2001).

A utilização de resíduos de pescado para a fabricação da silagem pode colaborar para a redução da poluição ambiental, originada pelo acúmulo desses materiais orgânicos, além de ser fundamental para reduzir o custo das rações (GUZMÁN; VIANA, 1998).

2.4 Micro-organismos envolvidos no processo de ensilagem

As bactérias produtoras de ácido láctico geralmente necessitam de vários aminoácidos e vitaminas para o crescimento (PAHLOW *et al.*, 2003). No entanto, apesar dessas complexas necessidades, dominam a fermentação da silagem quando estão em condições de anaerobiose. As bactérias lácticas podem crescer também em condições aeróbias e o peróxido de hidrogênio e o ácido láctico são frequentemente produzidos, ocasionando a morte de outros micro-organismos (CONDON, 1987). Muitas cepas dessas bactérias ainda produzem bacteriocinas, que podem inibir outras bactérias (GOLLOP *et al.*, 2005).

Lactobacillus spp. e Enterobacteriaceae constituem dois grandes grupos de bactérias que podem estar ativos em condições aeróbias e anaeróbias nas silagens de pescado. Alguns bacilos podem fermentar açúcares e ácidos orgânicos. No entanto a atividade em condições aeróbias

é considerada rara. A ação mais importante é o avanço da deterioração dos resíduos de pescado quando expostos ao oxigênio, produzindo silagem com aspecto pegajoso (MUCK; PITT, 1994).

De acordo com Pahlow *et al.* (2003), as bactérias produtoras de ácido láctico, presentes na silagem biológica de peixe, corresponderam aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

Bello *et al.* (1989) analisaram várias fontes de carboidratos para os micro-organismos utilizados em silagens de peixe na produção de ácido láctico. Foram utilizados como fontes de carboidratos: o milho, o arroz, a mandioca, a aveia, o melão e os micro-organismos *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis* e *Candida lipolytica*. Esses autores concluíram que a combinação de aveia, melão e *Lactobacillus plantarum* foi a mais eficaz para a produção de ensilado de peixe mais estável, com pH em torno de 4,0.

Wirahadikusumah *et al.* (1972), ao analisarem o desenvolvimento das bactérias lácticas durante os estágios de fermentação em silagem de pescado, observaram que o pH da silagem foi reduzido, principalmente com a ação dos *Streptococcus* spp., *Lactobacillus plantarum* e outros *Lactobacillus* spp. homofermentadores. Esses micro-organismos foram ativos na manutenção do baixo pH, durante o armazenamento.

Um estudo avaliou a produção de silagens de resíduos do processamento de sardinhas. Concluiu-se que foi viável a utilização de inóculos contendo *Lactobacillus plantarum* ou *Pediococcus acidilacti* e que o melão pode constituir substrato para esses micro-organismos (MORALES-ULLOA; OETTERER, 1995). De acordo com Hercules e Heyderyck (1985), a habilidade de *Lactobacillus* spp. na estabilidade dos resíduos, bem como a quantidade dessa bactéria e o tempo de estocagem da silagem de pescado influenciam, diretamente, a qualidade do produto fermentado.

Kompiang *et al.* (1981) verificaram que durante o processo de armazenamento da silagem de pescado acidificada, foram encontradas somente bactérias ácido-lácticas, evidenciando que micro-organismos patogênicos, como os coliformes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.,

foram inibidos pelo baixo pH do produto e pelas condições de anaerobiose, nas quais o ensilado foi armazenado.

As enterobactérias são as principais concorrentes das bactérias produtoras de ácido láctico. O principal produto da fermentação dessa família de bactérias é o ácido acético. Entretanto outros produtos da fermentação são o ácido succínico e 2,3-butanodiol e, por isso, a fermentação por Enterobacteriaceae é menos desejável do que a de bactérias lácticas (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006).

Algumas enterobactérias podem produzir endotoxinas, mas pouco se sabe sobre a atuação desses micro-organismos na silagem de pescado. Em um estudo, grandes quantidades de ácido acético produzidos pelo *Lactobacillus buchneri* na silagem não influenciaram o consumo pelos animais. Os autores admitiram, então, que as enterobactérias são a causa do baixo consumo devido a algum outro composto produzido, e não especificamente ao ácido acético (KLEINSCHMIT; KUNG, 2006).

Em uma pesquisa que verificou a presença de *Salmonella* spp. em silagem ácida, produzida a partir de tilápias inteiras, descartadas na despesca, com adição de 4% de ácido sulfúrico, constatou-se que a utilização de ácido no processo da ensilagem assegurou o pH final inferior a 4,0, eliminando, assim, essa bactéria patogênica (MENTI *et al.*, 2003). Ucci (2004) também não observou a presença de *Salmonella* spp. em silagens ácidas elaboradas com adição de ácido sulfúrico, fosfórico e fórmico em 4% ou adição de 2% de ácido sulfúrico com 2% de ácido fórmico, para o período de 90 dias de estocagem.

Bolosco *et al.* (2010), ao avaliar as características microbiológicas e bromatológicas da silagem ácida obtida de resíduos da indústria de filetagem de tilápia do Nilo não encontraram a presença de *Salmonella* spp., nas amostras analisadas. Os autores reportam que a adição de 5% de ácido acético na silagem não permitiu o desenvolvimento dessa enterobactéria.

Bactérias do gênero *Clostridium* são anaeróbias obrigatórias. Os efeitos desses micro-organismos sobre a qualidade da silagem de pescado geralmente ocorrem após a morte das bactérias lácticas. As espécies mais frequentes na silagem são as proteolíticas, que fermentam, aminoácidos, o

Clostridium butyricum, que fermenta carboidratos e o *Clostridium tyrobutyricum*, que fermenta alguns açúcares. Os proteolíticos produzem vários compostos que catabolizam aminoácidos em amônia, em aminas e em dióxido de carbono. Os produtos primários de *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum* são o ácido butírico, o ácido acético, o hidrogênio e o dióxido de carbono (McDONALD *et al.*,1991).

As leveduras são consideradas os mais importantes micro-organismos aeróbios, em relação à qualidade das silagens, uma vez que crescem em substratos solúveis contendo açúcares e ácido lático. É o primeiro grupo de micro-organismos a se desenvolver quando o oxigênio entra em contato com a silagem, tanto durante quanto no final do armazenamento. Esse fato ocorre porque esses fungos desenvolvem em pH em torno de 3,5, cujo valor é bastante baixo para silagens (MUCK, 2010).

Oliveira *et al.* (2006) promoveram análises microbiológicas da silagem ácida, produzida a partir de resíduos de filetagem de tilápia do Nilo no 1º, 15º e 30º dia de armazenamento. Os autores observaram que, no primeiro dia, houve crescimento de $1,2 \times 10^5$ bactérias mesófilas/g, com o número mais provável de coliformes totais (35°C), estimado em $2,4 \times 10^2$ /g de silagem. Fungos e leveduras corresponderam a 3×10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/g de silagem. Para os demais períodos avaliados, não houve crescimento desses micro-organismos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia de Alimentos e de Microscopia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Campus Regional de Montes Claros.

3.2 Processamento

Foram avaliadas duas silagens de pescado: a primeira acrescida de ácido acético (S1) e a segunda, de ácido láctico (S2). Foram avaliados cinco tempos de armazenamento de cada silagem produzida: T1 com um dia, T7 com sete dias, T14 com 14 dias, T21 com 21 dias e T28 com, 28 dias.

No tempo zero (T0), foram analisados os resíduos utilizados para a produção da silagem no momento do preparo, antes do processo de acidificação. Os peixes utilizados nesta pesquisa foram doados pela Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), campus Janaúba, com peso de ± 700 g e idade aproximada de seis meses.

Para preparo das silagens, peixes inteiros de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) passaram pelo processo de cocção (tratamento térmico por cozimento) durante 15 minutos e, posteriormente, foram moídos em multiprocessador elétrico. O material processado foi homogeneizado e armazenado inicialmente em dois béqueres estéreis. Parte desse material foi reservado para posterior análise microbiológica da matéria-prima e análises bromatológicas (T0). Amostras de 500g de material foram pesados em balança analítica e acondicionados em béqueres para adição de 5% de ácido acético glacial ou 5% de ácido láctico. Após a acidificação, cada silagem foi homogeneizada, com o auxílio de pistilos estéreis e acondicionada em tubos de ensaios vedados e estéreis cobertos por papel alumínio. Para cada tratamento e para cada tempo de armazenamento avaliado, foram preparados três tubos para, correspondendo às repetições do experimento (CARMO *et al.*, 2008). As silagens foram armazenadas em estufa BOD

(*Biochemical Oxygen Demand*) a 37°C e homogeneizadas diariamente, durante uma semana.

3.3 Análises físico-químicas e microbiológicas

O potencial hidrogeniônico (pH) foi estimado semanalmente com o auxílio de um potenciômetro digital. Características macroscópicas, como odor, tempo de liquefação e produção e cor do óleo, foram avaliadas, nos mesmos períodos.

As características micromorfológicas e tintoriais dos grupos bacterianos predominantes nas silagens coletadas, em todos os tempos de armazenamento, foram observadas após a realização de esfregaços secos, fixados e corados pelo método de Gram (QUIN *et al.*, 2005). Para leitura das lâminas preparadas, utilizou-se o método de cruces para representar a densidade bacteriana encontradas nos campos de visualização, onde uma cruz (+) representa poucas células, duas cruces (++) indica ocorrência moderada e três cruces (+++) alta densidade populacional microbiana (DIRKSEN, 1993).

Para análise e quantificação das populações microbianas, diluições decimais das duas silagens foram preparadas em tubos contendo nove microlitros (μl) de solução salina estéril. Após cada diluição, os tubos foram homogeneizados em vórtex durante dois minutos. *Swabs* estéreis com amostras das silagens e alíquotas de 100 microlitros das diluições foram inoculados em placas de petri estéreis contendo diferentes meios de cultura. Os inóculos das diluições foram homogeneizados sobre esses meios com alças de Drigalski estéreis e as placas foram incubadas em estufa BOD, a 37°C e monitoradas para o crescimento de colônias microbianas por até 21 dias (LACAZ *et al.*, 2002).

Para isolamento de Enterobacteriaceae, foi utilizado o meio de cultura Ágar Mac-Conkey e, para isolamento de fungos filamentosos e leveduras, utilizou-se o Ágar Sabouraud Dextrose, acrescido de cloranfenicol (300mg L^{-1}). *Staphylococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. foram avaliados em placas

contendo os meios Ágar Sal Manitol e Ágar MRS em jarra de anaerobiose, respectivamente (LACAZ *et al.*, 2002; QUIN *et al.*, 2005).

Para a identificação dos gêneros bacterianos de Enterobacteriaceae mais frequentes nas amostras de silagem, foram realizados o reisolamento e o cultivo em tubos contendo meio Ágar Mac Conkey em estufa, a 37°C, por 24 horas. Após o crescimento exponencial, cada isolado foi inoculado em tubos contendo meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva. Os tubos foram incubados em estufa BOD, a 37°C e, posteriormente, procedeu-se à leitura dos resultados após 24 horas, usando-se chave de identificação presuntiva de Enterobacteriaceae, de acordo com Pessoa e Silva (1972).

3.4 Análise bromatológica

A matéria-prima (peixe inteiro triturado) coletada no momento do processamento foi armazenada em freezer, e, juntamente com amostras das silagens com 28 dias de acidificação, foi enviada para análise, quanto à composição bromatológica da (MS) matéria seca, da proteína bruta (PB), do extrato etéreo (EE), do cálcio (Ca) e do fósforo (P), ao Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (AOAC, 1984).

3.5 Análises estatísticas

As médias de pH foram inicialmente avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA) em parcela subdividida. Contudo, como não foi observada interação significativa entre as variáveis independentes, as médias das silagens foram comparadas por ANOVA em um delineamento inteiramente ao acaso ($P < 0,05$). Já os diferentes tempos para cada silagem foram comparados pelo teste *Tukey* (5%).

Após análise exploratória dos dados de quantificação de microorganismos, observou-se que esses não apresentaram distribuição normal. Com isso, procedeu-se à transformação dos valores para $\text{Log}_{10}(X+1)$ e, após transformação, os dados de *Staphylococcus* spp. passaram a apresentar distribuição normal. Para verificar diferenças estatísticas, realizou-se ANOVA

em parcela subdividida. As médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* (5% de significância).

Foi observada interação significativa entre as variáveis independentes “silagem” e “tempo de armazenamento”. Os resultados estatísticos encontrados entre as duas silagens dentro de cada tempo foram apresentados em função do teste citado anteriormente. Para determinar o tempo ótimo de acidificação de cada silagem para redução da população desses micro-organismos, foi realizada regressão polinomial.

Em contrapartida, os dados de quantificação de fungos filamentosos e leveduriformes não apresentaram distribuição normal mesmo após transformação. Com isso, as médias foram avaliadas pelo teste não paramétrico de *Kruscall-Wallis*, com nível de significância de 5% (SAMPAIO, 1998).

As taxas de positividade dos micro-organismos foram avaliadas com o teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram processadas no pacote estatístico SAEG[®] – Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mensuração do pH

Após mensuração do pH das silagens estudadas, pôde-se observar que o pH médio da silagem láctica (3,71) foi significativamente menor em relação à silagem acética (4,03), com coeficiente de variação (C.V) igual a 5,25. As médias de pH em cada tempo de acidificação encontram-se dispostos na TAB. 1. Esses resultados evidenciaram que a acidificação foi mais eficiente para a silagem de pescado preparada com o acréscimo de 5% de ácido láctico.

TABELA 1

Valores de pH das silagens de pescado acidificadas com ácido lático ou acético em diferentes tempos de armazenamento

| Tempos avaliados | Silagem Láctica | Silagem Acética |
|------------------|-----------------|-----------------|
| T0 | 6,55 | 6,55 |
| T1 | 3,64 | 3,99 |
| T7 | 3,59 | 4,15 |
| T14 | 3,73 | 4,11 |
| T21 | 3,80 | 3,93 |
| T28 | 3,80 | 3,94 |
| Média (T1 a T28) | 3,71A | 4,03B |

Nota: T = tempos de armazenamento (zero, um, sete, 14, 21 e 28 dias). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si na ANOVA (P= 0,00024).

Os resultados indicam que o pH não diferiu, em função do tempo quando avaliado para cada silagem (P>0,05). Resultado semelhante foi registrado por Carmo *et al.* (2008). Ao final de 20 dias de armazenamento, esses autores observaram pH 4,37 em silagem de resíduos de tilápia produzida com ácido acético a 5%. Esses autores reportaram também que o pH baixo, como o observado na pesquisa, contribui para a qualidade microbiológica da silagem.

Valores de pH próximos a quatro reduzem a deterioração do alimento e promovem maior atividade de enzimas proteolíticas presentes no pescado (BELLO, 2004). Na presente pesquisa, pôde-se concluir que até 28 dias de armazenamento, ambas as silagens apresentam pH dentro da faixa ideal para esse tipo de ensilado.

4.2 Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica das silagens revelou que, em uma semana, ambas se liquefizeram. O odor ácido prevaleceu para as duas silagens durante todo o período de armazenamento. A produção de óleo foi observada após sete dias para ambos tratamentos, entretanto visivelmente observou-se maior produção para a silagem acética (FIG. 1). Vidotti e Gonçalves (2006) apontam que o ensilado convencional é acidificado a um pH entre 3,9 e 4,2 e, em três dias, liquefaz-se suficientemente, estabelecendo uma camada de lipídios e conservando a atividade enzimática durante muitos meses.

De acordo com a FAO (2004), o conteúdo lipídico é um bom indicador da qualidade da silagem de pescado, pois os ácidos graxos presentes no óleo de peixe são insaturados e, conseqüentemente, fáceis de serem oxidados. A oxidação pode reduzir a qualidade nutricional do produto, tornando as proteínas e os aminoácidos indisponíveis e/ou desagradáveis ao paladar.

O óleo produzido na silagem acética e na lática apresentou coloração castanho-alaranjada e castanho-esverdeada (FIG. 1), respectivamente. Não foram encontrados relatos na literatura científica que descrevam diferenças na coloração do óleo gerado em silagens de pescado acidificadas, relacionadas também à composição do óleo produzido. Futuros estudos devem verificar a qualidade e o perfil dos ácidos graxos da fração lipídica de ambas as silagens produzidas nesta pesquisa.



FIGURA 1 – Silagens ácidas de pescado acrescidas de ácido acético S1 e de ácido láctico (S2)

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2011.

4.3 Exame direto para detecção de bactérias e de leveduras

A leitura microscópica das lâminas após a coloração de Gram revelou predomínio de bactérias Gram negativas (++) , no T1, para ambas as silagens. Entretanto, pôde-se observar poucas células bacterianas no esfregaço desse tempo. Cocos Gram positivos foram detectados em maior proporção (+++) para S1 (FIG. 2) e, em menor, para S2 (++) (FIG. 3), com sete dias de armazenamento. A partir de 14 dias de fermentação, o perfil de coloração e micromorfológico de ambas silagens foram semelhantes ao encontrado em T7, entretanto, com menor ocorrência de células microbianas para ambos tratamentos (+). Não foram detectadas células leveduriformes, nos esfregaços visualizados.

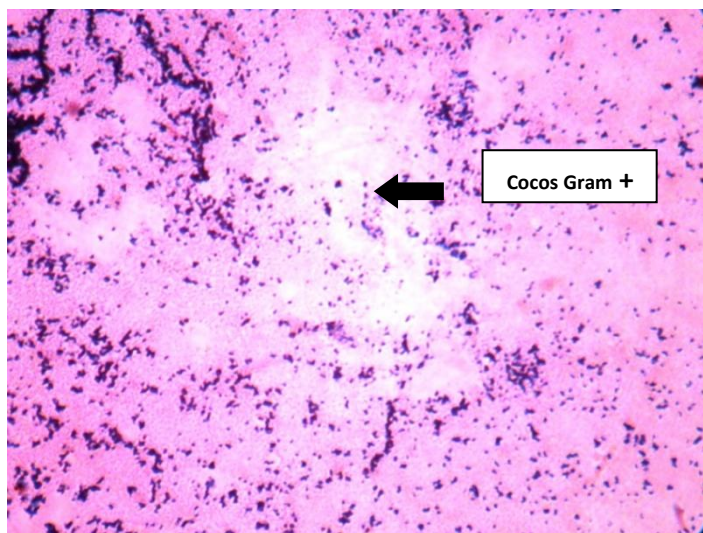


FIGURA 2 – Fotomicrografia de esfregaços da silagem de pescado, acrescida de ácido acético, com sete dias de armazenamento, após a coloração de Gram, objetiva de 100X

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2011.

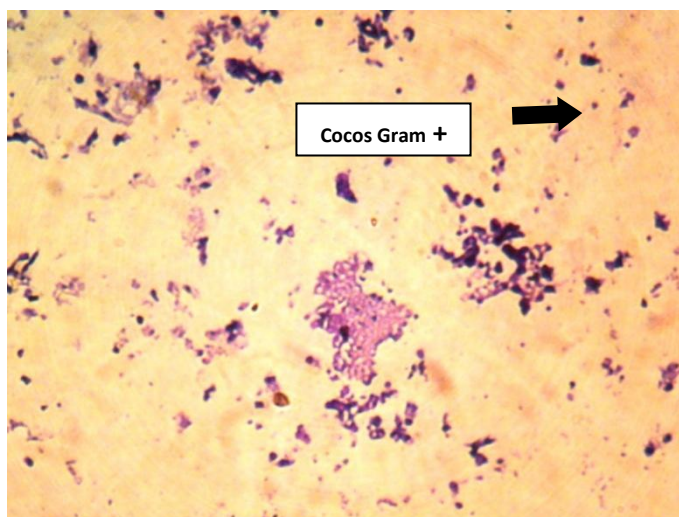


FIGURA 3 – Fotomicrografia de esfregaços da silagem de pescado, acrescida de ácido láctico, com sete dias de armazenamento, após a coloração de Gram, objetiva de 100X

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2011.

Acredita-se que esta pesquisa seja a primeira no Brasil a avaliar e descrever as características micromorfológicas de silagens ácidas de pescado, avaliadas pelo método de Gram. Não foram encontrados relatos, na literatura científica, que descrevam a análise microscópica direta, portanto, não foi possível apresentar dados comparativos nesta pesquisa. Contudo acredita-se que os resultados encontrados são indicativos da produção de silagem de pescado acrescida de ácido láctico com melhor qualidade, uma vez que se verificou maior redução do número de bactérias por campo em tempos inferiores de armazenamento (FIG. 3). Esta análise rápida e de baixo custo pode constituir um indicativo para os parâmetros de qualidade das silagens de pescado.

4.4 Cultivo, quantificação e identificação de micro-organismos

O cultivo de Enterobacteriaceae indicou média de $1,6 \times 10^4$ unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de matéria prima (T0), sendo 56,25% bactérias produtoras de lactase (Lac+) e 43,75 % bactérias não produtoras dessa enzima (Lac-). Essas bactérias foram ausentes para os tempos de armazenamento (T1, T7, T14, T21 e T28), para ambas as silagens, indicando bom efeito redutor após a adição dos ácidos utilizados nesta pesquisa.

Dentre os isolados caracterizados como bastonetes ou cocobastonetes Gram negativo, cultivados no Ágar Mac-Conkey para o tempo T0 (n=8), 50% foram identificados como *Escherichia coli*, 25% *Enterobacter*, 12,5% *Klebsiella* e 12,5% *Pseudomonas*. A ocorrência dessas bactérias na matéria prima da silagem de pescado, possivelmente justifica-se pelo fato de peixes inteiros terem sido processados e o conteúdo intestinal poderia ter contaminado o restante dos componentes da silagem. Entretanto, os ácidos testados mostraram-se eficientes no controle dessas bactérias enterozoonóticas.

Oliveira *et al.* (2006), ao estudarem Enterobacteriaceae em silagem ácida da filetagem de tilápia do Nilo, acrescida de ácido fórmico a 98% (3%), observaram a presença de coliformes totais no primeiro dia de armazenamento ($2,4 \times 10^2$ UFC/g). Entretanto, nesse mesmo estudo,

coliformes foram ausentes para o 15° ao 30° dia de armazenamento. Segundo Bolosco *et al.* (2010), a silagem de pescado, obtida a partir desses resíduos, com acréscimo de 5% de ácido acético, pôde ser armazenada durante 201 dias sem proliferação de *Salmonella* spp. ou outros coliformes.

Nesta presente pesquisa, foi constatado o desenvolvimento de fungos filamentosos e de leveduras até sete dias de armazenamento para S1 e S2. As médias de UFC encontram-se inseridas na TAB. 2. Isolados fúngicos foram ausentes em ambas as silagens para os dias 14, 21 e 28 de armazenamento.

TABELA 2

Médias de unidades formadoras de colônias de fungos por mL de silagens de pescado com ácido láctico ou acético, em diferentes tempos de armazenamento

| Tempos | Silagem acética | | Silagem láctica | |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Filamentosos | Leveduras | Filamentosos | Leveduras |
| 0 | 2 x 10 ³ A | 1 x 10 ³ a | 2 x 10 ³ A | 1 x 10 ³ a |
| 1 | 1 x 10 ³ A | 4 x 10 ³ a | 1 x 10 ³ A | 1 x 10 ³ a |
| 7 | 1 x 10 ³ A | 1 x 10 ³ a | 1 x 10 ³ A | 1 x 10 ³ a |
| 14 | 0A | 0a | 0A | 0a |
| 21 | 0A | 0a | 0A | 0a |
| 28 | 0A | 0a | 0A | 0a |

Nota: Médias para os tempos T1 a T28, seguidas de letras iguais, maiúscula para fungos filamentosos e, minúsculas para leveduriformes, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de *Kruscall-Wallis* (P<0,05).

Carmo *et al.* (2008) descrevem resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa. Fungos e leveduras foram ausentes para as silagens de pescado acidificadas com ácido acético, propiônico e fórmico, avaliadas após 20 dias de armazenamento.

Recomenda-se, na literatura científica, o uso de antimicóticos em silagem de pescados, como por exemplo, o ácido ascórbico, na concentração

de 0,25% (MACHADO, 2010). Entretanto, para as silagens produzidas na presente pesquisa, verificou-se que não seria necessária a utilização dos mesmos, uma vez que o processo de acidificação mostrou-se eficiente no controle de fungos aeróbios após quatorze dias de armazenamento.

Sabe-se que algumas leveduras podem conferir instabilidade ao produto armazenado em condições anaeróbicas. Algumas espécies podem utilizar o ácido láctico, aumentando o pH do produto fermentado, o que reduz o período de armazenamento das silagens (MACHADO, 2010).

Entretanto, em algumas ocasiões, fungos podem promover benefícios ao processo de ensilagem. Leveduras do gênero *Saccharomyces* e o fungo miceliano *Aspergillus oryzae* têm sido descritos como potenciais inoculantes em silagens biológicas de pescado (MACHADO, 2010).

A contagem de *Staphylococcus* spp. encontra-se na TAB. 3. Esse grupo bacteriano foi isolado para amostras dos tempos T0, T1 e T7, para ambas silagens. As concentrações observadas para essas bactérias foram relativamente mais elevadas quando comparadas aos demais grupos de micro-organismos. A partir de 14 dias de armazenamento, essas bactérias foram ausentes, para a silagem produzida com o ácido láctico e presentes, para a silagem com ácido acético. Provavelmente, o pH mais baixo observado nesta pesquisa para a silagem láctica inibiu o desenvolvimento desses micro-organismos.

TABELA 3

Taxa de positividade e quantificação de colônias de *Staphylococcus* spp., em silagens de pescado acidificadas com ácido láctico ou acético, em diferentes tempos de armazenamento

| Tempos | Silagem acética | | Silagem láctica | |
|--------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| | Positividade | (UFC/mL) | Positividade | (UFC/mL) |
| T0 | + | $1,1 \times 10^9$ | + | $1,1 \times 10^9$ |
| T1 | + | $5,4 \times 10^6$ A | + | $4,1 \times 10^6$ A |
| T7 | + | $1,0 \times 10^5$ A | + | $4,0 \times 10^5$ B |
| T14 | + | $7,3 \times 10^3$ B | - | 0A |
| T21 | + | 0A | - | 0A |
| T28 | + | 0A | - | 0A |

Nota: Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância (C. V.= 7,9%).

A análise estatística dos dados de contagem desses micro-organismos indicou interação significativa entre os tipos de silagem (parcela) e os diferentes tempos avaliados (subparcela). Entre as duas silagens avaliadas, pôde-se observar diferenças significativas ($P < 0,05$) para os dados de contagem com sete e quatorze dias de acidificação, entretanto, a partir de 21 dias, percebe-se que não incidem mais variações ($P > 0,05$) na ocorrência desses micro-organismos.

A produção de ácido láctico em silagens biológicas é fundamental, pois promove redução do pH (em torno de 4,0), inibindo, assim, o crescimento de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrosactu*, *Achromobacter* e *Pseudomonas* (VIDOTTI; GONÇALVES, 2006).

Simões *et al.* (2007) avaliaram a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em tilápias *in natura* e observaram número de UFC dentro da faixa adequada ($< 10^2$ UFC/g), estabelecida pela Agência de Vigilância Sanitária – (ANVISA). Entretanto outros trabalhos indicam que manipuladores

de piscicultura podem veicular *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para os peixes cultivados, para as instalações e também o ambiente de cultivo (MURATORI *et al.*, 2007). Esses trabalhos podem corroborar o esclarecimento da procedência de *Staphylococcus* spp. presentes nas silagens avaliadas nesta pesquisa, uma vez que os resíduos de pescados utilizados foram intensamente manipulados por trabalhadores.

Após análise de regressão, determinou-se o ponto ótimo, em função do tempo de armazenamento (variável independente) para cada silagem avaliada, buscando, assim, maior segurança alimentar, com menor ocorrência de *Staphylococcus* spp.. Para a silagem acrescida de ácido acético, foi estimado o tempo ótimo de 29,6 dias de incubação para a redução total dessas bactérias (FIG. 4). O valor foi determinado em função da equação: $Y = 6,627 - 0,2238X$ ($R^2 = 0,93$), onde Y é o número de *Staphylococcus* e X representa os tempos de armazenamento da silagem. Contudo, como o tempo estimado excedeu os limites testados neste experimento (28 dias), deve-se, em futuros estudos, promover a análise com um maior período de armazenamento para a confirmação desse período.

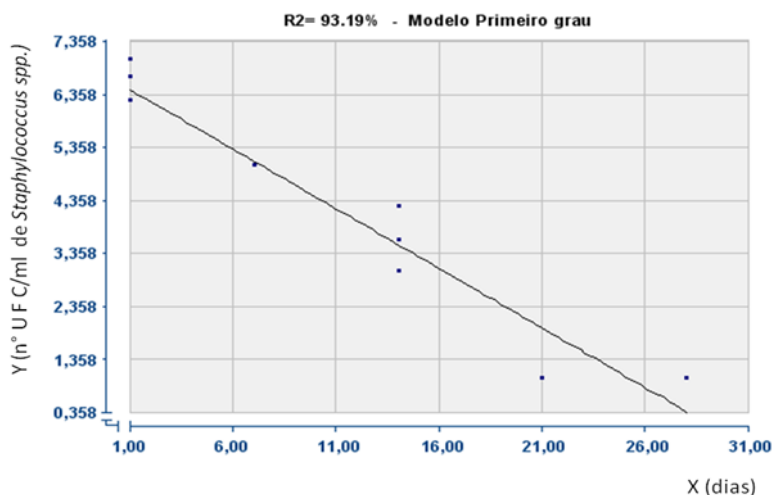


FIGURA 4 - Gráfico da população de *Staphylococcus* spp., em função do tempo de armazenamento da silagem acética

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2011.

O número UFC/mL de *Staphylococcus* spp., durante o período de armazenamento da ensilagem de peixe com ácido láctico, varia de acordo com a equação $Y = 4,7167 - 0,617 X$ ($R^2 = 0,90$), em que Y é o número de UFC de *Staphylococcus* / mL e X representa os tempos de armazenamento da silagem em dias. O tempo ótimo para estabilização da silagem, obtido pela derivada primeira igual a zero de Y em relação a X, seria de apenas 7,6 dias (FIG. 5).

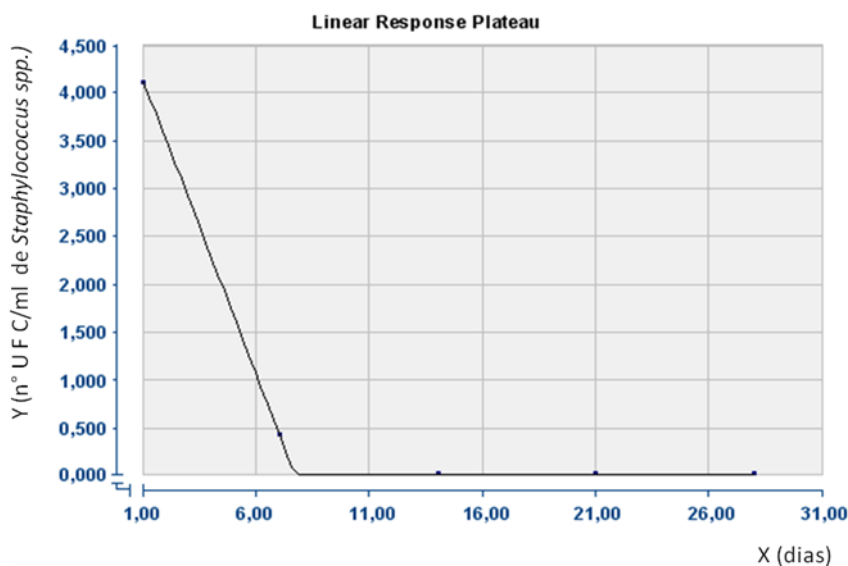


FIGURA 5 – Gráfico da população de *Staphylococcus* spp., em função do tempo de armazenamento da silagem láctica

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2011.

Lactobacillus spp. foram ausentes em todos os tempos de armazenamento para ambas silagens. Segundo Vidotti e Gonçalves (2006), a qualidade do produto final de ensilados fermentados está relacionada, naturalmente, à capacidade de *Lactobacillus* spp. de promover a estabilidade, bem como à quantidade e ao tempo de estocagem do pescado. Entretanto, como o processo de acidificação do ensilado ocorreu com a administração de 5% dos ácidos testados, é possível que a presença dessas bactérias tenha sido inibida após a administração ou tenha sido reduzida pela presença de outros micro-organismos.

4.5 Análises bromatológicas

Na TAB. 4, estão apresentados os valores de umidade (UM), de proteína bruta (PB), de extrato etéreo (EE), de cálcio (Ca) e de fósforo (P) das silagens ácidas e da matéria-prima, constituída por peixes inteiros triturados.

TABELA 4

Composições bromatológicas de duas silagens de pescado, com 28 dias de armazenamento e da matéria-prima, constituída de resíduos de tilápias

| Trat.* | UM (%) | PB (%) | | EE (%) | | Ca (%) | | P (%) | |
|--------|--------|--------|-------|--------|------|--------|------|-------|------|
| | | MS | MN | MS | MN | MS | MN | MS | MN |
| MP* | 80,58 | 60,38 | 11,73 | 16,16 | 3,14 | 4,32 | 0,84 | 2,49 | 0,48 |
| S1* | 78,31 | 56,62 | 12,28 | 12,65 | 2,74 | 5,53 | 1,20 | 3,50 | 0,76 |
| S2* | 75,20 | 45,34 | 11,24 | 7,56 | 1,87 | 4,53 | 1,12 | 2,65 | 0,66 |

Nota: *Tratamentos = Matéria-prima (MP); silagem acrescida de ácido acético (S1); silagem acrescida de ácido láctico (S2). Variáveis: proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cálcio (Ca), fósforo (P), umidade (UM), com base na matéria seca (MS) e na matéria natural (MN) (AOAC, 1984).

Pôde-se observar que os valores mensurados de umidade para ambas silagens encontram-se próximos aos descritos na literatura e dentro da normalidade para esse tipo de ensilado. Bolosco *et al.* (2010), ao avaliarem parâmetros bromatológicos da silagem acética produzida com resíduos de tilápia, observaram teores de umidade variando entre 67,4 e 73,0 %. Esses autores reportaram que o tempo de estocagem não influenciou os parâmetros de umidade, de matéria seca, cinzas e de extrato etéreo.

Resultados encontrados por Carmo *et al.* (2008) reforçaram a afirmativa acima, uma vez que a silagem acrescida de ácido acético, após 20 dias de ensilagem, apresentou teor de umidade de 70, 9% da matéria seca. Contudo observa-se que silagens produzidas somente com ácido fórmico apresentam teores de umidade inferiores aos encontrados nas silagens acéticas. Pimenta *et al.* (2008) descreveram valores de umidade da silagem com 3% de ácido fórmico (p/v), correspondendo a 40,1; 43 e 42,1%; com 1, 15 e 30 dias de acidificação, respectivamente.

Sabe-se que a obtenção de silagem com teor mais baixo de umidade é importante para a melhor estabilidade microbiológica do material produzido (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Entretanto, como demonstrado nos resultados microbiológicos desta presente pesquisa, a umidade elevada não proporcionou proliferação e aumento da população microbiana, na silagem acidificada e, possivelmente, o pH foi o fator regulatório mais importante para inibir a contaminação desse alimento.

O valor de PB encontrado nesta pesquisa para silagem acética é inferior ao observado por Carmo *et al.* (2008) (67,4% MS) e superior ao encontrado por Oliveira *et al.* (2006) (48,3% MS). A silagem lática apresentou menor teor de PB, quando comparado com os relatos acima, entretanto valor médio semelhante ao descrito por Pimenta *et al.* (2008), os quais encontraram valores de proteína variando de 39 a 48% da MS, em função de período de estocagem (1 a 30 dias). Ambas as silagens apresentaram alto valor de proteína bruta, que possivelmente contribuiu para o crescimento de *Staphylococcus* spp..

Variações de teores de proteína para silagens acidificadas, em função de tempos de estocagem, são justificadas pela ação de proteases endógenas presentes nos tecidos do peixe, que aumentam a solubilização da proteína (PIMENTA *et al.*, 2008).

Verificou-se que a silagem de ácido acético apresentou teor elevado de lipídeos. O valor observado encontra-se próximo aos valores encontrados por Carmo *et al.* (2008), que utilizaram o ácido acético, observando 14,2% de extrato etéreo, na silagem seca e Vasconcelos *et al.* (2011), que encontraram

13,3% de extrato etéreo, na silagem ácida de tilápia, ao adicionarem 1% de ácido cítrico e 6% de ácido acético.

O conteúdo de extrato etéreo na matéria-prima e na silagem é considerado importante parâmetro de qualidade do produto (PIMENTA *et al.*, 2008). Um dos pontos positivos, descrito por Ramos *et al.* (1994), é que a excessiva solubilização da proteína pode ser reduzida pelos lipídios provenientes da silagem, ocasionando assim, melhor qualidade. Entretanto também é verdade que a presença de óleo, com altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados, sujeitos à oxidação, reduz a palatabilidade do alimento e pode tornar a silagem imprópria ao consumo animal (PIMENTA *et al.*, 2008). Por isso, novas pesquisas têm avaliado as características dos ácidos graxos presentes na composição de óleos produzidos na silagem de pescado (VIDOTTI *et al.*, 2011).

Contrastando os resultados encontrados por Vasconcelos *et al.* (2011), o nível de cálcio em ambas silagens produzidas nesta pesquisa foi superior ao encontrado na matéria-prima utilizada para a confecção das mesmas. Esses autores apontaram que o conteúdo desse mineral apresenta tendência de queda ao longo do tempo de armazenamento, uma vez que observaram teores de 5,86 (%MS), na matéria-prima e 4,8 (%MS) no 34^o dia de acidificação. O valor mais elevado observado nesta pesquisa poderia ser justificado pela maior solubilização do Ca presente nas carcaças, com a acidificação da silagem (KOMPIANG *et al.*, 1981).

Os dados obtidos de fósforo para as duas silagens também foram superiores aos encontrados na análise bromatológica da matéria-prima. Futuros estudos deverão ser realizados para elucidar o mecanismo que promoveria o aumento da disponibilidade desses minerais durante o processo de ensilagem. O fósforo é fundamental para a estrutura óssea de peixes, sendo que a carência desse mineral pode inferir redução de crescimento, diminuição do aproveitamento do alimento e causar distúrbios no desenvolvimento ósseo nesses animais (PEZZATO *et al.*, 2004).

Esta foi a primeira pesquisa no Brasil que avaliou a produção da silagem de pescado acidificada com ácido láctico. Pôde-se verificar, que esse tipo de silagem apresenta perfil nutricional semelhante à silagem de pescado

produzida com ácido acético glacial e apresentou redução mais eficiente da população de *Staphylococcus* spp.. Futuros estudos devem ser promovidos, avaliando a composição bromatológica dessa silagem ao longo do período de armazenamento, além do nível de inclusão desses ácidos na biomassa do pescado, para se obter melhor viabilidade econômica para a utilização em dietas de peixes.

5 CONCLUSÃO

Observou-se que os ácidos acético e o lático foram eficientes para a redução e a manutenção do pH baixo da silagem de pescado até 28 dias de armazenamento. Com 7,6 dias de armazenamento, a silagem acrescida de ácido lático apresentaria ponto ótimo para a redução da população de microorganismos patogênicos e deteriorantes. As silagens de pescado acrescidas de ácido acético e de ácido lático possuem alto teor de proteína. Esse foi o primeiro relato de produção da silagem de pescado acidificada com ácido lático, que apresenta melhor queda de pH e redução mais rápida da população de *Staphylococcus* spp. quando comparada à silagem acrescida de ácido acético.

REFERÊNCIAS

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), **Official Methods of Analysis**, 14th edn., Washington, DC, 1984.

ARANA, L. V. Aquicultura e desenvolvimento sustentável: subsídios para formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Aquicultura brasileira**. Florianópolis: UFSC, p. 310, 1999.

BELLO, R. A. **Experiências com ensilado de pescado em Venezuela. Instituto de Ciências y Tecnología de Alimentos**. Caracas: Universidad Central de Venezuela, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/livestock/aphp134/cap1.htm>>. Acesso em: 23 maio 2011.

BELLO, R. A.; GUTIÉRREZ, M.; OTTATI, M.; MARTÍNEZ, A. Estudio sobre la elaboracion de ensilado de pescado por via microbiana en Venezuela. In: **Consulta de expertos sobre tecnologia de productos pesqueros en America Latina**. 2. Montevideo. Roma, FAO. 22 p., 1989.

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

BORGHESI, R. **Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 108 f., 2004.

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

CASTAGNOLLI, N. Piscicultura intensiva e sustentável de espécies nativas brasileiras. In: Simpósio e nutrição de peixes, Piracicaba. **Anais...** Campinas: CBNA, p.117-130, 1995.

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

CARVALHO, E. D. **Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas**. Relatório Científico (FAPESP). Botucatu, SP. p. 46, 2006.

CYRINO, J. E.; CONTE, L.; Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). **AquaCiência: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, cap. 12, p. 151-171, 2006.

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.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 267-280, 1987.

DIRKSEN G. 1993. **Sistema digestivo**. p.166-228. In: Dirksen G., Gründer H.D. & Stöber M. (ed.), Rosenberger's Exame Clínico dos Bovinos. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 419p.

DISNEY, J. G.; TATTERSON, I. N.; OLLEY, J. Recent developments in fish silage. In: Conference on the handling, processing and marketing of tropical fish, London, 1976. **Anais...** London: Ministry of Oversea Development, p. 321-340, 1977.

ESPE, M.; HANNLAND, H.; NJAA, L. R. Autolysed fish silage a feed ingredient for Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Composition Biochemistry Physiology**, v. 103, n. 2, p. 369-372, 1992.

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 Food and Agriculture**, v. 79, n. 2, p. 327-332. 1999.

FAGBENRO, O.; JAUNCEY, K.; HAYLOR, G. Nutritive value of diets containing dried lactic fermented fish silage and soybean meal for juvenile *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. **Aquatic Living Resource**, v. 7, p. 79-85, 1994.

FAGBENRO, O.; JAUNCEY, K. Water stability, nutrient leaching and nutritional properties of moist fermented fish silage diets. **Aquacultural Engineering**, v. 14, p. 143-153, 1995.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Feeding pigs in the tropics. **FAO Animal Production and Health**, n.132. 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 jan. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2010.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; BOSCOLO, W. R.; CYRINO, J. E. P.; FURUYA, V. R. B.; FEIDEN, A. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Editor Wilson M. Furuya. -- Toledo: GFM, 100. p. 2010.

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.

GOLLOP, N.; ZAKIN, V.; WEINBERG, Z. G. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 662-666, 2005.

GUZMÁN, J. M.; VIANA, M. T. Growth of abalone *Haliotis fulgens* fed diets with and without fish meal, compared to a commercial diet. **Aquaculture**, v. 165, p. 321-331, 1998.

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

HERCULES, J. V. W. E HEYDENRYCH, C. M. S. The production of naturally fermented fish silage using various Lactobacilli and diferent carbohydrate sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 36, p. 1093-103, 1985.

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. 93-103, 1994.

HIRSCH, D.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LOGATO, P. V. R.; PICCOLI, R. H.; FIGUEIREDO, H. C. P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciências Agrotecnologia**. Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, 2006.

HONCZARYK, A.; MAEDA, L. S. Crescimento do pirarucu, *Arapaima gigas*, utilizando dieta à base de ensilado biológico de pescado. In: Simpósio brasileiro de aquicultura, Recife, 1998, **Anais...** Recife: Persona, v. 2, p. 93-100, 1998.

HUSSAIN, R. A. K.; OFFER, N. W. Effect of folmadehyde treatment o the degradation of acid-preserved fish protein in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 16, p. 297-304, 1987.

JACKSON, A. J.; KERR, A. K.; BULLOCK, A. M. Fish silage as a dietary ingredient for salmon. II. Preliminary growth findings and nutritional pathology. **Aquaculture**, v. 40, p. 283-291, 1984.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR., L. A meta-analysis of the effects of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation and aerobic stability of corn and

grass and small-grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4005-4013, 2006.

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

KUBITZA, F. Tilápia: **Tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1ª ed. Jundiaí. 289 p. 2000.

KUMAR, V.; AKINLEYE, A. O.; MAKKAR, H. P. S.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; BECKER, K. Growth performance and metabolic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet containing *Jatropha platyphylla* kernel meal as a protein source. **Journal of animal physiology and animal nutrition**. v. 96, n. 1, p. 37-46, 2012.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Savier, 1120 p. 2002.

MACHADO, T. M. **Silagem biológica de pescado**. 2010. Disponível em: <[ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/simbiolpesc.pdf](http://ftp.sp.gov.br/ftppesca/simbiolpesc.pdf)>. Acesso em: 25 de mai. 2011.

MAIA JR, W. M.; NARAIN, N.; BORA, P. S.; NUNES, M. L. Aminoacid composition of tilapia (*Oreochromis niloticus*) residue silage. In: International symposium on tilapia aquaculture, 5., Rio de Janeiro, 2000. **Anais...** Rio de Janeiro: American Tilapia Association, p. 446-450, 2000.

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.

McDONALD, P.; HINDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2 ed. Marlow: Chalcombe Publications, 340 p., 1991.

MENTI, M. M.; SIGNOR, A.; MARTINS, C. V. B.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Investigação de *Salmonella* na silagem de pescado de água doce. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 2003, Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro, 2003. p. 1110-1114.

MORALES-ULLOA, D. F.; OETTERER, M. Bioconversão de resíduos da indústria pesqueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 252-258, 1995.

MPA – Ministério da pesca e aquicultura. Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil 2008/2009. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08-Producao-de-pescado-aumenta>. Acesso em: 08 de Fev. 2012.

MUCK, R. E.; PITT, R. E. Aerobic deterioration in corn silage relative to the silo face. **Transactions of the ASAE**, v. 37, n. 3, p. 735-743, 1994.

MUCK R. E., Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p.183-191, (supl. especial) 2010.

MURATORI, M. C. S.; COUTO FILHO, C. C. C.; ARARIPE, M. N. B. A.; LOPES, J. B.; COSTA, A. P. R. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em manipuladores de piscicultura. **Revista Científica Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 120-126, 2007.

OLIVEIRA, M. M. de. **Caracterização química, biológica e utilização da silagem ácida de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), para alevinos de tilápia e girino de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802)**. Alfenas: Unifenas, 2005. 81 f., Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano. Alfenas, 2005.

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

OTTATI, M.; GUTIERRES, M.; BELLO, R. Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de espécies subutilizadas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 4, n. 3, p. 408-425, 1990.

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F. **Microbiology of ensiling**. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) Silage science and technology. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, p. 31-93, 2003.

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de Enterobacterias. **Revista - Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, p. 97-100, 1972.

PEZZATO, L. E. ; BARROS, M. M. ; FRACALOSSO, D. M. ; CYRINO, J. E. P. . Nutrição de Peixes. In: José Eurico Possebom Cyrino; Elisabeth Criscuolo Urbinati; Débora Machado Fracalossi; Newton Castagnolli. (Org.). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. 1 ed. São Paulo, v. 1, p. 75-169, 2004.

PIMENTA, M. E. S. G. FREATO, T. A. DE OLIVEIRA, G. R. Silagem de pescado: uma forma interessante de aproveitamento de resíduos do processamento de peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 4, p. 592-598, 2008.

QUIN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, W. J.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, p. 512, 2005.

RAA, M. E. J.; GILDBERG, A. Fish silage: a review. **Journal of the Food Science and Nutrition**, v. 61, p. 383-419, 1982.

RAMOS O, V., DORADO, M. y CARO, E. O. **Ensayo sobre la alimentación de la cachama negra (*Colossoma macropomum*) con pescado en los ácidos orgánicos e inorgánicos (ensilaje de pescado)**. Boletín Científico INPA, [S.l.], v. 2, p. 46-61, 1994.

RIVERO, L. E.; VIANA, M. T. Effect of pH, water stability and toughness of artificial diets on the palatability for juvenile abalone, *Haliotis fulgens*. **Aquaculture**, v. 144, p. 353-362, 1996.

SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2. Ed. 263 p. 1998.

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

SIMÕES, M. R.; RIBEIRO, C. F. A.; RIBEIRO, S. C. A.; PARK, K. J.; MURR, F. E. X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 608-613, 2007.

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

UCCI, P. **Produção de silagem de pescado a partir de resíduo de industrialização de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2004. 32 f., Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Engenharias e ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2004.

VASCONCELOS M. M. M.; MESQUITA, M. S. C. DE; ALBUQUERQUE, S. P. Padrões físico-químicos e rendimento de silagem ácida de tilápia. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, n. 1, p. 27-37, 2011.

VIDOTTI, R. M.; CARNEIRO, D. J.; MACEDO-VIEGAS, E. M. 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.; GONÇALVES, G. S. **Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal.** 2006. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/producao_caracterizacao.pdf>. Acesso em: 24 de mai. 2011.

VIDOTTI, R. M.; PACHECO, M. T. B.; GONÇALVES, G. S. Characterization of the oils present in acid and fermented silages produced from Tilapia filleting residue. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 240-244, 2011.

VIZCARRA-MAGAÑA, L. A.; AVILA, E.; SOTELO, A. Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in broilers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1915-1922, 1999.

WIRAHADIKUSUMAH, S., RAJALA, O., LINDGREN, S., NILSSON, R. Development of Lactic Acid Bacteria during Early Stages of Fermentation in Fish Silage. **Archive Mikrobiol**, v. 82, p. 95-100, 1972.

ZAHAR, M.; BENKERROUM, N.; GUEROUALI, A. 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.