

ALIMENTAÇÃO DE ALEVINOS REVERTIDOS DE TILÁPIA DO NILO
Oreochromis niloticus, A PARTIR DE CARÇAÇAS DE PEIXE, DE HORTALIÇAS,
DE FRUTOS E DO AGUAPÉ, *Eichhornia crassipes*.

MARIA PETRONÍLIA DE OLIVEIRA STUDART GURGEL

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - CE

2002

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Maria Petronília de Oliveira Studart Gurgel

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/04/2002

Dra. Norma Maria Barros Benevides
Orientadora

Dr. Fernando Monteiro de Paula
Examinador

Dra. Silvana Saker Sampaio
Examinadora

Dr. Jorge Avelino Falcão Paredes
Examinador

Dra. Célia Maria de Souza Sampaio
Examinadora

Dedico:

Ao meu pai, Raimundo Nonato de Oliveira, por ter transmitido, durante sua vida, conceitos e atitudes que pareciam tão pequenos, mas que na verdade se transformaram em fortes alicerces durante minha vida.

À minha mãe, Cleonice Batista de Oliveira, pelos conselhos e carinhos.

Ao meu companheiro Guilherme por sua compreensão, paciência e aceitação.

À minha filha querida Caroline, pelos momentos de carinho e serenidade, pelas suas cartinhas, sempre, expressando suavidade e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tornar as coisas possíveis.

À Professora Dra. Norma Maria Barros Benevides pela sua orientação que durante o desenvolvimento deste trabalho me enriqueceu de grande conhecimento científico e humano.

Ao Departamento de Engenharia de Pesca por ter me liberado para realizar o Curso de Doutorado em Bioquímica.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, seus professores, funcionários e colegas.

Ao Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DNOCS).

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial (NUTEC) situado no Campus do Pici.

À mestre em Tecnologia do Pescado e técnica do DNOCS, Maria do Socorro Chacon Mesquita, pelo acompanhamento dos ensaios biológicos, pela amizade e atenção demonstradas durante o desenvolvimento desse estudo.

Ao Pedro Mesquita, mestre em aquicultura, pela orientação muito importante. Alexandre, técnico do DNOCS, Roque e a todos funcionários do DNOCS que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse estudo.

Ao diretores do NUTEC, Dr. Elieú Paranhos de Almeida, Diretor de Pesquisas e Desenvolvimento e Dr. Francisco de Assis Ferreira Lima, Diretor de Divisão de Alimentos.

Ao Laboratório de Recursos Aquáticos (LARAq), por ter cedido suas instalações e reagentes.

À Professora do Departamento de Engenharia de Pesca, MSc. Artamiza Maria Nogueira Montezuma, pela orientação nas formulações dos fermentos e ensilados.

Ao Professor, Dr. Antônio Aduato Fonteles Filho e Professora Dra. Silvana Saker Sampaio, pela orientação nos cálculos e interpretação estatística, utilizados nessa tese.

À Dra. Ana Cristina Monteiro Moreira e ao Professor Dr. Renato Azevedo Moreira pela orientação e análises de aminoácidos.

Ao Professor Dr. Fernando Monteiro de Paula pela orientação nas análises de ácidos graxos.

À Professora Ilka Maria de Vasconcelos pela sua compreensão e orientação, e seu grande desempenho como Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica.

À MSc. Danielle de Oliveira Bezerra de Souza pelas análises de atividade anti-trípica.

Aos amigos, do Laboratório de Algas Marinhas, Edna Nascimento, Edna Pereira, Maria, Rodrigo, Luana, Yaskara, Marjory, Noélia, Stélio e Nawber.

Finalmente, à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta Tese.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xvi
<u>RESUMO</u>	xviii
<u>ABSTRACT</u>	xxi
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2. <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	5
2.1. Aguapé <i>Eichhornia crassipes</i>	5
2.1.1. Características	5
2.1.2. Aproveitamento Econômico	7
2.2. Lectinas	9
2.3. Proteínas Tóxicas	11
2. 4. Inibidores de Tripsina	15
2.5. Tilápia do Nilo <i>Oreochromis niloticus</i>	16
2.5.1. Informações Gerais	16
2.5.2. <i>O. niloticus</i> Linhagem Tailandesa	18
2.5.3. Reversão Sexual	20
2.5.4. Cultivos Comerciais de <i>O. niloticus</i>	23
2.6. Aproveitamento dos Resíduos Industriais	24
2.7. Ensilados	25
2.7.1. Informações Gerais	25

2.7.2. Ensilado Químico	26
2.7.3. Ensilados Enzimático	29
2.7.4. Ensilado Biológico	31
2.8. Ração	36
2.8.1. Informações Gerais	36
2.8.2. Macronutrientes	40
2.8.2.1. Proteínas e Aminoácidos	40
2.8.2.2. Extrato Etéreo	44
2.8.2.3. Ácidos Graxos	44
2.8.2.4. Cálcio e Fósforo	49
2.8.2.5. Fibras	50
2.8.3. Micronutrientes	50
2.8.3.1. Vitaminas e Fatores de Crescimento	50
2.8.3.2. Microminerais	51
3. <u>OBJETIVOS</u>	55
3.1. Geral	55
3.2. Específicos	55
4. <u>MATERIAIS</u>	57
4.1. Folha e Pecíolo do Vegetal <i>E. crassipes</i>	57
4.2. O Mamão <i>Carica papaya</i> e o Repolho <i>Brassica oleracea</i> var capitata	57
4.3. Carcaças de Pargo <i>Lutjanus purpureus</i>	57
4.4. Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo <i>O. niloticus</i> Linhagem Tailandesa	58

4.5. Células Sangüíneas	58
4.6. Animais de Experimentação	58
5. <u>METODOLOGIA</u>	59
5.1. Preparação do Extrato Total	59
5.2. Determinação da Atividade Hemaglutinante	59
5.3. Atividade Tóxica	60
5.4. Atividade Anti-trípica	60
5.5. Elaboração dos Fermentos	61
5.6. Elaboração dos Ensilados Biológicos	61
5.7. Determinação do Grau de Acidez Láctica	62
5.8. Elaboração das Rações	63
5.9. Composição Química das Folhas e Pecíolos de <i>E. crassipes</i> , dos Ensilados e das Rações	64
5.9.1. Determinação de Umidade	64
5.9.2. Determinação de Cinzas	64
5.9.3. Determinação de Nitrogênio Total	65
5.9.4. Determinação de Lipídeos Totais	66
5.9.5. Determinação de Fibras	67
5.9.6. Determinação de Cálcio	68
5.9.7. Determinação de Fósforo	69
5.9.8. Determinação de Ferro	70
5.9.9. Determinação de Magnésio	70
5.9.10. Determinação de Vitamina C	77
5.9.11. Composição de Aminoácidos	72

5.9.12. Determinação dos Ácidos Graxos	72
5.10. Ensaio Microbiológicos	74
5.11. Ensaio Biológico de Alimentação	77
5.12. Análise Estatística	78
6. <u>RESULTADOS</u>	79
6.1 - Características Químicas e Biológicas de Folhas e Pecíolos de <i>E. crassipes</i>	79
6.1.1. Atividade Hemaglutinante	79
6.1.2. Atividade Tóxica	79
6.1.3. Atividade Anti-trípica	80
6.1.4. Composição de Aminoácidos	80
6.1.5. Composição de Ácidos Graxos	82
6.1.6. Composição Química Elementar	82
6.2. Fermentos Biológicos	85
6.2.1. Grau de Acidez e pH	85
6.3. Ensilados	89
6.3.1. Grau de Acidez e pH	89
6.3.2. Variação na Composição Química Elementar dos Ensilados	95
6.3.3. Composição Química Elementar dos Ensilados Semi- secos	97
6.3.4. Composição em Aminoácidos	99
6.3.5. Composição em Ácidos Graxos	99
6.3.6. Análise Microbiológica dos Ensilados durante o	

Período de Incubação	100
6.3.7. Avaliação Sensorial	105
6.4. Ração	105
6.4.1. Composição Química Elementar	105
6.4.2. Composição em Aminoácidos	107
6.4.3. Composição em Ácidos Graxos	108
6.4.4. Ensaio Biológico de Alimentação	111
7. <u>DISCUSSÃO</u>	122
7.1. Folhas e Pecíolos de Aguapé	122
7.1.1. Lectinas	122
7.1.2. Atividade Anti-trípica	122
7.1.3. Proteínas Tóxicas	123
7.1.4. Composição em Aminoácidos	124
7.1.5. Composição em Ácidos Graxos	124
7.1.6. Composição Elementar	125
7.2. Fermento Biológico	126
7.2.1. Grau de Acidez e pH	127
7.3. Ensilados	127
7.3.1. Grau de Acidez e pH dos Ensilados	129
7.3.2. Composição Elementar dos Ensilados	131
7.3.3. Composição em Aminoácidos	133
7.3.4. Composição em Ácidos Graxos	134
7.3.5. Análise Microbiológica	135
7.4. Ração	137

7.4.1. Composição Química Elementar	137
7.4.2. Composição em Aminoácidos	138
7.4.3. Composição em Ácidos Graxos	138
7.4.4. Ensaio Biológico de Alimentação	138
7.4.5. Análises Estatísticas	141
8. <u>CONCLUSÕES</u>	142
9. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	145

LISTA DE TABELAS

TABELAS		PÁGINAS
1	Guia prático de macronutrientes, expressos em porcentagem, de rações completas para peixes onívoros com dados de recomendação do NRC (1993) e sugestões do Comitê de Organismos Aquáticos - COAq. .	39
2	Requerimento mínimo dos 10 aminoácidos essenciais, na dieta e na proteína da dieta.	42
3	Composição de aminoácidos, análise proximal de algumas fontes protéicas e energia líquida disponível.	43
4	Nomenclatura dos ácidos graxos saturados.	45
5	Nomenclatura dos ácidos graxos monoinsaturados.	46
6	Nomenclatura dos ácidos graxos poliinsaturados.	47
7	Exigências nutricionais de vitaminas, requeridas por salmões, trutas e carpas, em mg/g da dieta seca	52
8	Guia de enriquecimento vitamínico e mineral para rações completas de peixes onívoros. Dados coletados do NRC (1993) e sugestões do COAq.	53
9	Níveis de minerais recomendáveis para o cultivo de diversas espécies de peixes.	54

TABELAS

PÁGINAS

10	Composição em aminoácidos (%) em relação a porcentagem de proteína presente nas folhas e pecíolos de <i>Eichhornia crassipes</i>	81
11	Composição em ácidos graxos (%) de folhas e pecíolos de <i>Eichhornia crassipes</i>	83
12	Composição química elementar de folhas e pecíolos de <i>Eichhornia crassipes</i>	84
13	Variações do grau de acidez (%) e pH desenvolvidas durante o processamento dos fermentos biológicos I e II.	86
14	Variações do grau de acidez (%) e pH observadas durante o processamento dos ensilados I, II, III e IV.	90
15	Variações na composição elementar (%) durante o processamento dos ensilados I, II, III e IV.	96
16	Composição elementar dos ensilados semi-secos III, IV e V.	98
17	Composição em aminoácidos (%) em relação a porcentagem de proteína presente nos ensilados III, IV e V.	101
18	Composição em ácidos graxos (%) presentes nos ensilados III, IV e V.	102
19	Resultado da análise microbiológica durante o processamento do ensilado III.	103

TABELAS

PÁGINAS

20	Resultado da análise microbiológica durante o processamento do ensilado IV.	104
21	Composição elementar, em porcentagem, das rações I, II e III.	106
22	Composição em aminoácidos (%) em relação a porcentagem de proteína presente nas rações I, II e III. ..	109
23	Composição em ácidos graxos (%) presentes nas rações I, II e III.	110
24	Ensaio de alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> , L., 1766) com a ração comercial da FRI-PEIXE para alevinos (controle).	113
25	Ensaio de alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> , L., 1766) com a ração I. ..	114
26	Ensaio de alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> , L., 1766) com a ração II. .	115
27	Ensaio de alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> , L., 1766) com a ração III..	116
28	Análise de variância dos resultados de comprimento total, altura e peso dos ensaios biológicos com alevinos revertidos de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i> , L., 1766) - alimentados com as rações I, II, III e comercial (controle).	120

TABELAS

PÁGINAS

29	Teste de Tukey aplicado às médias de comprimento total, altura e peso dos alevinos revertidos de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i> , L., 1766), alimentados com as rações I, II e III e comercial (controle).	121
----	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINAS
1	Aguapé da flor roxa <i>Eichhornia crassipes</i>	6
2	a) <i>Oreochromis niloticus</i> linhagem do Nilo e b) <i>Oreochromis niloticus</i> linhagem tailandesa.	19
3	Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do fermento biológico I.	87
4	Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do fermento biológico II.	88
5	Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado I.	91
6	Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado II.	92
7	Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado III.	93
8	Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado IV.	94
9	Comprimento Total (L) médio dos alevinos de <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com as rações I, II, III e comercial.	117

FIGURAS

PÁGINAS

10	Altura (H) dos alevinos de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com as rações , I, II, III e comercial.	118
11	Peso médio (ω) dos alevinos de tilápia <i>Oreochromis niloticus</i> alimentados com as rações I, II, III e comercial.	119

RESUMO

O presente trabalho teve como finalidade elaborar suplementos protéicos para a alimentação de alevinos de tilápia do Nilo revertida *Oreochromis niloticus* a partir de ensilados biológicos constituídos de carcaças de peixes, hortaliças e frutos inadequados ao consumo humano e do aguapé *Eichhornia crassipes*. Os estudos preliminares de fatores antinutricionais e tóxicos, realizados com extratos totais de folhas e pecíolos de *E. crassipes* em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, demonstraram ausência de atividade hemaglutinante contra eritrócitos, tratados enzimaticamente com tripsina e bromelaína, de humano do sistema ABO e dos animais coelho e galinha e toxicidade para camundongos por injeção intraperitoneal. A atividade anti-trípica determinada nos extratos alcalinos de folhas e pecíolos de *E. crassipes*, apresentou uma leve e semelhante inibição da tripsina de 0,9 mg de tripsina/g de farinha de folhas e pecíolos. Na análise da composição elementar de *E. crassipes*, as folhas apresentaram grande quantidade de proteína total (21,63%) quando comparada com a encontrada nos pecíolos (3,21%). Além disso, as folhas e pecíolos apresentaram altos teores de carboidratos totais, 53,43 e 64,37%, respectivamente. A análise da composição de aminoácidos das folhas e pecíolos de *E. crassipes* revelou a presença dos aminoácidos essenciais em quantidades maiores que as requeridas na alimentação de peixes, com exceção da metionina. A determinação da composição de ácidos graxos nas folhas e pecíolos de *E. crassipes* mostrou maiores teores dos ácidos octadecatrienóico (44,41%) e hexadecanóico (38,89%) nas folhas e do

hexadecanóico (69,56%) nos pecíolos. O fermento I estabilizou no pH em torno de 4,0 e o fermento II em torno de 3,3. Os ensilados, III e IV, utilizados na elaboração das rações, apresentaram grau de acidez 4,73 e 3,69%, respectivamente e pH de 4,5. A análise elementar dos ensilados III, IV e V mostrou elevados teores de proteína total 29,75, 29,90 e 30,20%, respectivamente. A composição de aminoácidos dos ensilados III, IV e V apresentou maiores teores dos aminoácidos essenciais do que os requeridos pelos peixes, com exceção da metionina. Na análise da composição dos ácidos graxos, o ensilado III apresentou maiores teores dos ácidos hexadecanóico (43,72%) e octadecenóico (22,16%), o ensilado IV dos ácidos hexadecanóico (34,49%) e octadecadienóico (22,68%) e o ensilado V dos ácidos hexadecanóico (37,14%) e octadecenóico (21,96%). Os teores de proteínas totais das rações I (33,50%), II (32,40%) e III (31,0%) mostraram-se semelhantes aos requeridos (33%), para a alimentação de alevinos de tilápias. As rações, I, II e III, apresentaram maiores teores de aminoácidos essenciais que os requeridos na alimentação de peixes, com exceção da metionina. Além disso, elas apresentaram em sua composição de ácidos graxos, o ácido linoléico (18:2), considerado essencial na alimentação de animais. Na análise da taxa de aumento de peso com as rações I, II, III e comercial, foi demonstrado que os alevinos alimentados com as rações II e III atingiram peso de 60 g em 75 dias de cultivo, enquanto que os alimentados com as rações III e comercial só atingiram esse peso após 90 dias. A análise estatística das medidas de comprimento total, altura e peso dos alevinos de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* alimentados com as rações, I, II, III e comercial, mostrou

uma diferença significativa entre as médias de altura e peso dos alevinos alimentados com as rações I e II em relação ao obtido com a ração comercial. Portanto, os resultados apresentados sugerem que as rações I e II podem ser utilizadas na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

The present work had the purpose to elaborate proteic supplements for the feeding reverted fingerlings of the tilapia of Nile *Oreochromis niloticus* using biological silage constituted of fish carcasses, vegetables, inadequate fruits for human consumption and water hyacinth *Eichhornia crassipes*. In the preliminary studies, accomplished with total extracts of leaves and petioles of *Eichhornia crassipes* in 25 mM Tris- HCl buffer pH 7,5, to detect antinutritional and toxic factors, was demonstrated absence of the hemagglutinating activity towards trypsin and bromelain-treated human, rabbit and chicken erythrocytes and toxicity for mice when injected intraperitoneally. The anti-triptic activity in the alkaline extracts of leaves and petioles of *E. crassipes* presented a light and similar inhibition of 0,9 mg of trypsin/g of meal of leaves or petioles. The analysis of the amino acids composition revealed higher amounts of essential amino acids in the leaves and petioles of *E. crassipes* than those requested in the fish feeding, except of the methionine. The determination of the fatty acids composition in the leaves and petioles of *E. crassipes* showed high contents of the acids octadecatrienoic (44,41%) and hexadecanoic (38,89%) in the leaves and of the hexadecanoic (69,56%) in the petioles. In the analysis of the elementary composition of *E. crassipes*, the leaves presented higher amount of total protein (21,63%) than those obtained in the petioles (3,21%). Besides, the leaves and petioles presented high contents of total carbohydrates, 53,43 and 64,37%, respectively. The ferment I stabilized with pH around 4,0 and the ferment II around 3,3. The silage III and IV used in the elaboration of the rations

presented degree of acidity 4,73 and 3,69%, respectively and pH of 4,5. The proximate analysis of silage III, IV and V showed high contents of total protein 29,75, 29,90 and 30,20%, respectively. The amino acids composition of silages III, IV and V presented higher contents of the essential amino acids than those requested by fishes, except of the methionine. In the fatty acids of the silage III presented high contents of the acids hexadecanoic (43,72%) and octadecenoic (22,16%), the silage IV of the acids hexadecanoic (34,49%) and octadecadienoic (22,68%) and the silage V of the acids hexadecanoic (37,14%) and octadecenoic (21,96%). The contents of total proteins of the rations I (33,50%), II (32,40%) and III (31,0%) show that these values are similar those (33%) required to the feeding of tilapia fingerlings. The rations, II and III, presented higher contents of essential amino acids than those requested in the feeding of fish, except for the methionine. Besides, they showed in their chemical composition the linoleic acid (18:2), considered essential in the animal feeding. In the analysis of the gain of weight, it was demonstrated that the fingerlings fed with II and III rations reached weight of 60 g in 75 days of culture, while those fed with III and commercial rations only reached that weight after 90 days. The statistical analysis of total length, height and weight measures of the reversal fingerlings of tilapia of Nile *Oreochromis niloticus* fed with I, II, III and commercial rations, showed a significant difference between the height and weight averages of the fingerlings fed with I and II rations in relation to obtained with the commercial ration. These results presented here suggest that these rations I and II can be used to feeding fingerlings of tilapia of Nile *Oreochromis niloticus*.

1. INTRODUÇÃO

O aguapé da flor roxa *E. crassipes* (Mart.) Solms (*Pontederia crassipes* Mart.) é uma planta aquática de desenvolvimento rápido em alguns rios, lagos e outros ambientes aquáticos de água doce, multiplicando-se de forma tal que chega a cobrir uma grande parte da superfície aquática trazendo problemas para a navegação, produtividade do meio e pesca. Durante décadas têm-se utilizado herbicidas como o bi-hedonal (Braga & Nepomuceno, 1969) para erradicar essa erva daninha. No entanto, a utilização dessa substância química não mostrou bons resultados, porque além de não ter erradicado o aguapé, causava poluição das águas interiores, prejudicando a agricultura, a pesca e a aqüicultura e colocando em risco a saúde dos banhistas dessas águas. Preocupado com a multiplicação desse vegetal, em 1997 o Banco Mundial incentivou, através de financiamentos de milhões de dólares, a comunidade científica a desenvolver pesquisas visando o aproveitamento e beneficiamento de *E. crassipes* para fins alimentares, industriais etc. Desta forma, surgiram novos direcionamentos para o futuro do *E. crassipes*, seja como complemento de rações para animais (Mitra *et al.*, 1997a), alimentação de búfalos (Mitra *et al.*, 1997b), preparação de celulose (Barsi *et al.*, 1997), no combate do patógeno, *Sclerotium rolfsii*, que ataca o milho através de suas cinzas (Enikuomehin *et al.*, 1998), como potencial de fósforo e nitrogênio para rações

utilizadas na aqüicultura (Woomer *et al.*, 2000) ou para produção de biogás (Kivaisi & Mtila, 1998).

Apesar de alguns trabalhos terem sido direcionados para a utilização de *E. crassipes* na alimentação de animais, até o presente nada foi relatado sobre a composição e biodisponibilidade dos aminoácidos essenciais, ausência de toxicidade ou propriedades nutricionais, bem como, a sua composição em ácidos graxos (Marquez & Lajolo, 1988).

Uma proteína de alto valor biológico deve possuir não somente todos os aminoácidos em quantidades e proporções adequadas, particularmente os essenciais, mas também a propriedade de torná-los disponíveis, a fim de que as funções corporais normais dos seres vivos sejam mantidas.

Além das toxinas produzidas por microorganismos que podem contaminar os alimentos, algumas proteínas de ocorrência natural apresentam propriedades tóxicas e/ou antinutricionais. Dentre os diferentes constituintes dotados de atividades tóxicas e/ou antinutricionais, destacam-se: lectinas, inibidores de proteases, lipoxigenases, toxinas, ureases, taninos etc. (Liener *et al.*, 1986; Duffus & Duffus, 1991; Vasconcelos *et al.*, 1994).

A aqüicultura é o segmento da produção animal que mais cresce no mundo. Entre 1984 e 1990, sua expansão foi de 14% ao ano. Estudos realizados pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) mostram que a produção brasileira cresceu de 26.800 para 30.750 toneladas entre 1992 e 1994. Estima-se que, nos anos seguintes, a aqüicultura brasileira tenha produzido 45.000 toneladas. Com a ascensão dessa atividade no Brasil, crescem também as expectativas de desempenho

produtiva e econômica no cultivo de peixes, utilizando diferentes tipos de rações. Considerando as diferentes espécies de peixes, a nutrição apresenta-se como uma grande área de estudos, em que não cabem generalizações e cada caso merece atenção. Apesar dessa necessidade de inovações nas rações para acompanhar o crescimento na aquicultura, as investigações nesse setor ainda são incipientes (Alimentação Animal, 1997)

O avanço da tilapicultura no mundo inteiro está levando a uma intensificação dos cultivos de tilápia. Apesar de atualmente se dispor de diversas populações de tilápias com excelente desempenho zootécnico, uma das mais procuradas no mercado brasileiro é a chitralada, mais conhecida como tailandesa (Zimmermann, 2000).

A tilápia tem várias vantagens em relação a outras espécies de peixes, pois adapta-se com facilidade às mudanças ambientais e apresenta grande resistência a doenças. Entretanto, sua rápida reprodução provoca uma superpopulação nos viveiros (Guilherme, 1990), aumentando, portanto, a competição por alimento, oxigênio e espaço. Em decorrência disso, os indivíduos apresentam tamanhos pequenos e têm baixa aceitação no mercado. Visando um melhor desempenho na criação de tilápia, vários estudos têm sido realizados na tentativa de mostrar métodos confiáveis de produzir indivíduos de um determinado sexo. Entre esses métodos podem ser citados: sexagem, hibridização e reversão sexual, sendo que o tratamento hormonal, além de garantir a manutenção de cultivo monosexo, induz o aumento da altura dos alevinos de tilápia do Nilo, *O. niloticus* (Silva, 2000).

Um dos maiores inconvenientes na prática da aquicultura é o alto custo das rações, apesar de existir um grande desperdício de hortaliças e frutos nos supermercados, restos do abate e processamento de animais que podem ser utilizados como ingredientes de uma ração de baixo valor econômico. Somente na indústria pesqueira, a nível mundial, há um desperdício decorrente do processamento e beneficiamento de pescado em torno de 28%, referente as aparas, vísceras, cabeças e ossos (Oetterer, 1994). Esse material poderia ser biotransformado (ensilados) em um alimento rico em proteínas para enriquecer rações para animais.

Os ensilados de pescado podem ser obtidos através de uma mistura contendo pescado, uma fonte de carboidrato e um inóculo de bactérias láctica (ensilado biológico); pescado e ácidos (ensilado químico) e pescado e enzimas (ensilado enzimático).

Associando a carência de informações sobre o valor nutritivo de *E. crassipes*, sua facilidade e abundância no ambiente aquático, o desperdício da indústria do pescado e de frutos e hortaliças inadequados para a alimentação humana e o alto custo da ração destinada à aquicultura, esse trabalho teve como objetivo elaborar suplementos protéicos para a alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo *O. niloticus*, linhagem tailândesa, a partir de ensilados biológicos constituídos carcaças de peixes, hortaliças e frutos inadequados ao consumo humano e do aguapé *E. crassipes*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aguapé *Eichhornia crassipes*

2.1.1. Características

O vegetal *E. crassipes* pertence a ordem Heteranthera, família Pontederiaceae e gênero *Eichhornia*.

O aguapé da flor roxa *E. crassipes* (Mart.) Solms. (*Pontederia crassipes* Mart.) possui caule comprido, vistosas flores azuis ou lilacinas, dispostas em espigas (FIGURA 1). Em certos meios, cresce com tal exuberância a ponto de formar grandes ilhas flutuantes, capazes de criar sérios problemas à navegação. Pode ser usada como forrageira, e o chá de suas folhas é considerado um depurativo energético. Seu nome vulgar varia de acordo com a região. Na Amazônia, é chamada mururé de Canudo, em Pernambuco, de baronesa e nos estados meridionais, de aguapé, pavo, orelha de onça e paraci (Braga, 1953).

O aguapé *E. crassipes* se desenvolve em ambientes aquáticos, sendo encontrado em abundância nos viveiros de água doce, cobrindo quase totalmente a lâmina d'água e, por conseqüência, impedindo a penetração da luz solar nas camadas inferiores da água, diminuindo, por sua vez, a produtividade primária.



FIGURA 1 - Aguapé da flor roxa *Eichhornia crassipes*.

O vegetal *E. crassipes* tem expandido-se em muitos rios e lagos do leste da África, dificultando o acesso de trabalhadores e afetando a biodiversidade (Woomer, 1997). O crescimento desse vegetal em alguns lagos da África foi controlado após a ajuda do Banco Mundial que investiu 8,3 milhões de dólares em programas de exploração e controle de *E. crassipes* (Pearce, 1998).

O excesso de plantas aquáticas interfere na economia de muitos países. No Brasil o problema se agrava, afetando a pesca e a piscicultura nas águas interiores. Os açudes no Nordeste brasileiro são freqüentemente invadidos por plantas aquáticas. O mesmo tem sido constatado em viveiros de peixes tanto em estados da região do Nordeste (Braga, 1951), quanto no Rio de Janeiro (Silva, 1960).

Com objetivo de controlar o crescimento desordenado do aguapé *E. crassipes* no açude Caucaia no Estado do Ceará, Braga & Nepomuceno (1969) utilizaram o herbicida químico bi-hedonal [2,4-diclorofenoxi-acético (2,4-D) + metilclorofenoxi-acético (MCPA)] que possibilitou o rápido aumento de seu rendimento pesqueiro.

2.1.2. Aproveitamento Econômico

Apesar dos efeitos indesejáveis do vegetal *E. crassipes*, essa erva daninha tem alguns usos econômicos, dentre os quais a produção de gás metano através de sua digestão anaeróbica (Mwadamwar *et al.*, 1990). Kivaisi & Mtila (1998) produziram um biogás com 80% de metano a partir das raízes de *E. crassipes*. Embora Gopal (1987) tenha sugerido que o *E. crassipes* não

seja palatável para a alimentação de animais, Solly *et al.* (1984) questionaram que ele poderia ser oferecido, na forma processada, como complemento de rações, principalmente, para a alimentação de animais em regiões com recursos escassos como no Nordeste do Brasil e Oeste da África (Ssekabembe & Sabaiiti, 1997).

Woomer *et al.* (2000) estudaram a mineralização do N e P das folhas, pecíolos e raízes de *E. crassipes*, em condições anaeróbicas e aeróbicas juntamente com melão e farelo de milho, colocando-os submersos no lago por 16 semanas. Os autores concluíram que *E. crassipes* processado poderia ser utilizado para a fertilização do solo e para alimentação de animais.

Mitra *et al.* (1997a) estudaram a inclusão de *E. crassipes*, sem raízes e rizomas, de forma *in natura* e processada, sendo adicionado em várias proporções à rações oferecidas a machos de búfalos. Os autores estudaram ainda, seu desempenho em relação ao paladar e ao crescimento e concluíram que essa ração contendo *E. crassipes* processado por fermentação apresenta um melhor paladar quando comparado com a ração na qual foi adicionada *E. crassipes in natura*. Mitra *et al.* (1997b), estudaram o valor nutritivo de *E. crassipes* oferecida, na forma fresca e seca, como alimento para búfalos e concluíram que não existia diferença entre as duas formas oferecidas com relação ao balanço do nitrogênio, cálcio e fósforo, mantendo ambas formas um balanço positivo do ganho de peso durante o período experimental.

2.2. Lectinas

De acordo com o conhecimento atual sobre lectinas, o pré-requisito para uma proteína ser denominada como tal é a presença de pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a mono ou polissacarídeos, sem induzir qualquer modificação química nos mesmos (Peumans & Van Damme, 1995). Esses autores subdividiram as lectinas em três grupos principais: (a) merolectinas - proteínas pequenas constituídas exclusivamente de um único domínio ligante a carboidratos, e que devido à sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células; (b) hololectinas - proteínas compostas de domínios ligantes a carboidratos possuindo dois ou mais desses domínios que podem ser iguais ou homólogos; este grupo compreende todas as lectinas com múltiplos sítios de ligação que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados; e (c) quimerolectinas - proteínas que além do domínio ligante a carboidrato, possuem um outro domínio, não relacionado com este, apresentando uma atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida, mas que age independentemente das regiões ligantes a carboidratos. O número de sítios ligantes a açúcar determina seu comportamento, seja como holo ou merolectinas.

Posteriormente, Van Damme *et al.* (1998) sugeriram mais um tipo de lectina, as superlectinas, um tipo especial de quimerolectinas. Elas seriam proteínas de fusão, com dois domínios de ligação a carboidratos, que são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos. Apenas um exemplo desta classe é conhecido atualmente, a lectina de bulbo de tulipa, com dois domínios, um específico para N-acetilgalactosamina e outro para manose.

Distribuídas amplamente na natureza, as lectinas podem ser encontradas em quase todos os organismos vivos, microorganismos, vírus, algas, animais (vertebrados e invertebrados) e plantas.

As lectinas formam um grupo de proteínas heterogêneas, do ponto de vista estrutural, pois variam quanto ao tamanho, estrutura e organização molecular, contudo, apresentam em comum a capacidade de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados. Assim, a característica mais importante dessas proteínas é que elas se ligam a mono ou oligossacarídeos de uma maneira reversível e com alta especificidade (Lis & Sharon, 1998).

Devido a sua capacidade de reconhecer específica e reversivelmente carboidratos e aglutinar células, as lectinas podem ser usadas como excelentes e versáteis ferramentas biológicas para o estudo de glicoconjugados de superfície de células normais ou alteradas, além de uma infinidade de aplicações em outras áreas das ciências biológicas. O grande número de lectinas isoladas e purificadas tem mostrado uma significativa variedade de estrutura, de distribuição e de propriedades biológicas, além da variação dentro dos diferentes tecidos de um mesmo organismo, o que pode refletir uma ampla adaptação de funções (Sharon & Lis, 1989).

Muitos polissacarídeos insolúveis são adsorventes sensíveis para o isolamento de lectinas. No entanto, precisam estar completamente livres de materiais que possam ser liberados por lixiviação durante a cromatografia. Assim, diversos gliconjugados naturais têm sido usados, entre eles: estromas de células vegetais (Luck *et al.*, 1992), estromas humanos glutarizados (Moreira & Oliveira, 1983), quitina (Whitmore, 1992), oligossacarídeos solúveis tratados com agentes formadores de ligação cruzadas, como a epícloridrina ou divinilsulfona (Moreira, 1998), mono, oligossacarídeos e gliconjugados imobilizados em matrizes gelatinosas hidrofílicas.

Para Chrispeels & Raikhel (1991), apesar de intensos estudos, as lectinas ainda formam um grupo de proteínas com funções fisiológicas pouco entendidas, mas como se ligam a carboidratos específicos, são consideradas moléculas de reconhecimento. Esse reconhecimento pode ser em três níveis distintos, seja ele no interior de células, entre diferentes células do mesmo organismo ou ainda entre células de diferentes organismos. Contudo, estas proteínas têm se revelado como valiosos instrumentos em diversos campos de pesquisa, permitindo a elucidação de alguns mecanismos bioquímicos e fisiológicos de importância nos diferentes campos da biologia.

2.3. Proteínas Tóxicas

As substâncias de natureza protéica encontradas nos vegetais, e que ocasionam efeitos biológicos adversos a organismos estranhos, são quimicamente bastante diversificadas.

Proteínas vegetais apresentando atividade tóxica são conhecidas há bastante tempo. Entretanto, até o final do século XIX, acreditava-se que esse efeito era consequência da contaminação de sementes por toxinas bacterianas. Somente após inúmeras investigações ficou estabelecido a distinção entre uma intoxicação de origem bacteriana daquela induzida por componentes tóxicos presentes nas sementes.

O perfeito equilíbrio da biodiversidade existente na natureza é proporcionado por um complexo sistema de defesa e agressão existente entre os seres vivos. Esse sistema é resultante da capacidade que um determinado organismo possui em sintetizar substâncias químicas, que são tóxicas para os demais, evitando a superpopulação de uma espécie em detrimento de outras. A interação hospedeiro-patógeno pode ser encarada como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência (Pascholati & Leite, 1995).

Inicialmente, pensava-se que o mecanismo de ação tóxica dessas proteínas fosse decorrente de propriedades hemaglutinantes de seus extratos protéicos. Mas, já está bem estabelecido que a atividade hemaglutinante está associada a lectina, enquanto a fração protéica tóxica apresenta fraca ou nenhuma atividade hemaglutinante (Olsnes *et al.*, 1974). Algumas toxinas protéicas vegetais (ricina e abrina) apresentam semelhanças estruturais com as lectinas, mesmo possuindo distintos mecanismos de ação. Ao contrário das lectinas, no entanto, as proteínas tóxicas contêm apenas um sítio de ligação para carboidratos, sendo por isso denominadas hemilectinas (Carlini *et al.*, 1988; Carlini & Guimarães, 1991). Essas proteínas produzem apenas aglutinação indireta de células. Esse processo é mediado por anticorpos e,

como as lectinas, pode ser inibido por excesso do açúcar específico.

Além da ricina e abrina, várias proteínas tóxicas de vegetais são conhecidas como proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), em decorrência da atividade inibitória sobre a síntese protéica em células eucarióticas. Algumas destas proteínas podem se ligar e penetrar nas células, comportando-se como uma das substâncias mais tóxicas conhecidas. Entretanto, a maioria delas é incapaz de penetrar em células sadias sendo, portanto, fracamente citotóxicas (Hartley & Chaddock, 1996).

Pelo fato das proteínas serem nutrientes essenciais aos organismos animal e humano, deve-se levar em consideração além de seu conteúdo e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, a ausência de toxicidade e/ou de propriedades antinutricionais (Carnovale *et al.*, 1990; Sgarbieri, 1996).

A distinção entre componentes tóxicos e antinutricionais é que os tóxicos agem de forma aguda, produzindo lesões nos órgãos e tecidos, bem como alterações fisiológicas que resultam em enfermidades, podendo, inclusive, causar a morte de pessoas ou animais que os ingerem. Os componentes antinutricionais, por sua vez, são considerados aqueles que embora não causem alterações teciduais e fisiológicas evidentes, atuam diminuindo a eficiência metabólica, interferindo com a utilização dos nutrientes (Sgarbieri, 1996). Estes fatores, nos vegetais, podem ter diferentes naturezas químicas: (a) protéica (proteínas inativadoras de ribossomos - RIPs, lectinas, inibidores de proteases, toxinas, alérgenos e urease) e (b) não-protéica (taninos, fitatos, alcalóides, glicosídeos cianogênicos, oxalatos e fatores de flatulência). As investigações bioquímica e biológica, de um modo geral, desses compostos

fornecem dados para o melhoramento das espécies bem como a utilização de tais constituintes nas mais diversas áreas: agricultura, farmacologia, medicina, imunologia, toxicologia, entre outras (Vasconcelos *et al.*, 1994).

A presença de substâncias tóxicas em algas está relacionada com a função de proteção contra a ação destruidora de uma gama de predadores naturais, os quais competem entre si por alimento e por outros fatores de sobrevivência. As algas marinhas, assim como os vegetais, produzem metabólitos secundários (terpenos, compostos aromáticos, acetogeninas, substâncias derivadas de aminoácidos e polifenóis), diferindo somente na incorporação de halogênios em seus compostos e por produzirem alcalóides contendo nitrogênio. Esses metabólitos, freqüentemente, são espécies ou gêneros-específicos, podendo ser utilizados como critérios quimiotaxonômicos na separação de espécies morfológicamente semelhantes dentro de um mesmo habitat (Fenical, 1982; Hay *et al.*, 1987; Hay & Fenical, 1988).

Proteínas vegetais apresentando atividade tóxica letal para diferentes animais ou diferentes células, através da inibição da síntese protéica ou de outros mecanismos, vêm recebendo cada vez mais atenção por parte de diferentes grupos de pesquisa. Portanto, estudos concentrados na detecção dessas proteínas em algas marinhas, foram iniciados por Benevides *et al.* (1998), quando analisaram dez espécies de algas pertencentes às famílias Rhodomelaceae, Gelidiaceae, Hypneaceae, Solieriaceae e Gracilariaceae.

Outras proteínas tóxicas com mecanismo de ação diferente das RIPs, porém, presentes em plantas, são as neurotoxinas, cuja ação envolve o sistema nervoso central (SNC). Exemplos destas são a canatoxina e a

soyatoxina (Carlini & Guimarães, 1981; Vasconcelos *et al.*, 1994).

2. 4. Inibidores de Tripsina

Inibidores de tripsina são proteínas ou polipeptídeos distribuídos em quase todos os organismos. No reino vegetal são encontrados nas sementes, tubérculos, folhas e frutos (Xavier-Filho, 1992).

Os inibidores de proteinases serínicas, dos quais fazem parte os inibidores de tripsina, são os mais estudados. Em leguminosas, esses inibidores são divididos em dois tipos: Bowman-Birk e Kunitz. Os inibidores protéicos do tipo Bowman-Birk se caracterizam por apresentarem peso molecular relativamente baixo (8-9 kDa) e elevado conteúdo de cisteína, formando sete pontes dissulfeto intracadeias. Este inibidor é considerado de dupla-cabeça, por apresentar capacidade de formar complexos estequiométricos com enzimas, inibindo diferentes proteinases, usualmente tripsina e quimiotripsina. Os inibidores da família Kunitz são de cadeia monomérica, com peso molecular em torno de 21 kDa, contendo quatro resíduos de cisteína, os quais formam duas pontes dissulfeto. Este inibidor protéico é considerado de cabeça única, sendo específico para a tripsina, mesmo apresentando capacidade de inibir, fracamente, a quimiotripsina (Norton, 1991).

Os inibidores de proteinases possuem múltiplas funções, entre as quais: regulação de proteínas endógenas, reserva protéica e defesa. Algumas plantas contêm inibidores de proteinases com função regulatória, por apresentarem

proteínas que são insensíveis a inibidores endógenos. Os inibidores de proteinases que atuam como reserva protéica, em sementes e raízes tuberosas, são mobilizados ao longo da germinação e do brotamento. Entretanto, algumas evidências foram obtidas apoiando essa função para os tubérculos de batata, enquanto, para sementes, ela mostrou-se ambígua. Com relação à defesa, os inibidores de proteinases fornecem proteção para diferentes partes da planta (sementes, folhas e tubérculos) contra o ataque por insetos e microorganismos. A evidência mais significativa apoiando essa hipótese foi a demonstração de que o ataque das folhas de plantas de batata e tomate por insetos, induz o acúmulo de inibidores do tipo Bowman-Birk e Kunitz nas partes aéreas dessas plantas (D'Melo *et al.*, 1991).

2.5. Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*

2.5.1. Informações Gerais

A tilápia do Nilo *O. niloticus* pertence a ordem Perciformes, família Cichlidae e gênero *Oreochromis* (FIGURA 2). A criação de peixes é uma prática muito antiga tendo a tilápia sido registrada em pinturas egípcias confirmando o seu cultivo desde aproximadamente há 2.500 anos a.C., daí então passou a ser chamada por especialistas israelenses como peixe de São Pedro (Popma & Lovshin, 1995).

Pezzato (1984) considera a tilápia do Nilo *O. niloticus* uma excelente espécie para a piscicultura brasileira por ser de fácil manuseio, de grande

rusticidade, alta capacidade de reprodução, aceitação de arraçoamento artificial e de ser bem aceita no mercado por sua boa qualidade de carne.

Outras vantagens tornam esta espécie mundialmente cultivável, dentre elas podem ser citadas, a sua alimentação corresponde a base da cadeia trófica, aceitando uma gama de alimentos naturais, principalmente plânctons e macrófitas, dessa forma, apresentando uma resposta afirmativa à fertilização dos viveiros, além disso, é uma espécie de grande resistência a doenças (Hiltsdorf, 1995). O mesmo autor afirma que a tilápia possui boas características organolépticas, tais como: carne saborosa, baixo teor de gordura, ausência de espinhos em forma de y (mioseptos) e rendimento de filé de aproximadamente 35 a 40% em exemplares com peso médio de 0,45 Kg.

Segundo a FAO (1998), a tilápia do Nilo *O. niloticus* (L. 1766) ocupa o décimo lugar das espécies aquáticas cultivadas mundialmente. Ela foi transplantada da Costa do Marfim, África, para o Centro de Pesquisas Ictiológicas "Rodolpho von Ihering" do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS). Após a sua aclimação, passou a ser disseminada nos açudes controlados pelo DNOCS a partir de 1973, tendo apresentado em 1993 uma produção de 2.459,3 toneladas em 82 açudes, ocupando o primeiro lugar na produção total (Diretoria de Pesca e Piscicultura - DNOCS) (Freitas & Gurgel, 1984).

A precocidade sexual e a alta viabilidade de larvas provocam uma elevada taxa reprodutiva em peixes de tamanho pequeno. Em virtude disso, são utilizados métodos que podem solucionar esse problema, sendo o mais

utilizado atualmente, a reversão sexual através da administração de esteróides sexuais na alimentação das larvas antes desses terem o sexo definido.

Segundo dados divulgados pelo Ministério da Agricultura, nos últimos cinco anos o cultivo de tilápias cresceu muito. Em 1996, os cálculos demonstraram que o Brasil produziu 60 mil toneladas de pescado e a tilápia liderou essa produção, representando cerca de 32% do total. Em 1998, a produção foi de 90 mil toneladas, das quais 38% de tilápia (Silva, 2001).

2.5.2. *O. niloticus* Linhagem Tailandesa

O avanço da tilapicultura no mundo inteiro está levando a uma intensificação dos cultivos. Um dos sintomas desta intensificação é a busca por linhagens de performance superior. Apesar de atualmente se dispor de diversas populações de tilápias com excelentes desempenhos zootécnicos, uma das mais procuradas no mercado brasileiro é tailandesa. Essa linhagem desenvolvida no Japão e melhorada no Palácio Real de Chitralada, na Tailândia foi introduzida no Brasil em 1996 a partir de alevinos doados pelo Asian Institute of Technology (AIT) e vem sofrendo processo de melhoramento genético nos últimos quatro anos (Zimmermann, 2000). Esta espécie chegou ao Estado do Paraná por iniciativa do projeto ALEVINOPAR, para utilização em cultivos intensivos e superintensivos (Zimmermann, 1999).



a)



b)

FIGURA 2 - a) *Oreochromis niloticus* linhagem do Nilo e b) *Oreochromis niloticus* linhagem tailandesa.

A linhagem tailandesa de *O. niloticus* tem fenótipo parecido com as que vieram da Costa do Marfim, no que se refere à coloração das fêmeas. No entanto, apresenta forma do corpo arredondada, com reduzido tamanho da cabeça, o que lhe confere rendimento de carcaça superior. No que se refere à coloração, as fêmeas apresentam tonalidade amarelada na região gular, enquanto que os machos apresentam coloração avermelhada na mesma região (Zimmermann, 1999).

A linhagem tailandesa de *O. niloticus* tem apresentado excelentes resultados no Nordeste, em cultivos experimentais, sendo obtidos indivíduos com peso médio de 660 g em 112 dias de cultivo em viveiros, e 650 g em 133 dias em tanques-rede. A linhagem da Costa do Marfim atingiu 505 g após 147 dias de cultivo em tanques-rede (Silva, 2001).

Nos cultivos intensivos em viveiros são criados machos das tilápias *O. niloticus*, principalmente das linhagens tailandesa e vermelha obtidos por reversão sexual, em densidades de estocagem que chegam a 60 mil peixes/ha. Esses são alimentados com rações industriais, peletizadas ou extrusadas com elevado teor protéico.

2.5.3. Reversão Sexual

Conforme Guilherme (1990), nas criações de tilápias ocorre um grande problema de proliferação, afetando o crescimento das mesmas, havendo necessidade de um controle para o desenvolvimento do cultivo.

O sucesso da piscicultura depende do controle e de manipulação de algumas funções fisiológicas dos peixes, entre elas a reprodução. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de mostrar métodos confiáveis de produzir indivíduos de um determinado sexo.

Vários métodos foram utilizados por Kovacs (1990) e Hiot & Phelps (1993) para obter populações de um mesmo sexo de tilápias. Entre eles estão os métodos genéticos e não genéticos. Nos métodos genéticos podem ser citados a utilização de hormônios, sendo a técnica mais empregada, a manipulação do sexo fenotípico do peixe pelo tratamento com esteróides.

O tratamento hormonal além de garantir a manutenção do cultivo monosexo induz o aumento da altura em alevinos de tilápia *O. niloticus* (Silva, 2000).

Na década de 90 passou-se a adotar o cultivo de machos das tilápias do Nilo e vermelha, obtidos através de reversão sexual, em substituição ao cultivo de machos sexados (Popma & Green, 1990; Ribeiro, 1996; Amorim, 1999; Marengoni, 1999; Zimmermann, 1999).

O hormônio mais usado nas tilapiculturas nordestinas é o 17α - metil-testosterona na dosagem de 60 mg/Kg de ração, cuja aplicação é feita através da ração (Kovacs *et al.*, 1994). Na preparação, o hormônio, em forma de pó fino, é pesado e diluído em álcool absoluto, sendo em seguida essa solução obtida misturada uniformemente com a ração, em uma operação feita, quase sempre, com as mãos, evitando-se o contato com a pele mediante o uso de luvas e outros dispositivos. A mistura constituída de ração e hormônio é posta para secar à sombra e em camadas de até 5 cm por 24 horas. A ração é

oferecida na forma finamente granulada, passada em peneira de malha em torno de 0,5 mm, para que as pós-larvas possam degluti-la (Marengoni, 1999; Zimmermann, 1999). Recentemente, indústrias lançaram no comércio rações para reversão sexual de tilápias contendo até 56% de proteína bruta (Zimmermann, 2000).

No tratamento hormonal, as pós-larvas capturadas são levadas, em baldes de plástico, para pequenos tanques cobertos medindo, geralmente, 3 x 1 x 1 m³, onde são selecionadas. O selecionador é do tipo peneira, com malha de 2,8 a 3,0 mm. As que passam nas malhas seguem para a reversão, pois têm cerca de 10 dias de vida, comprimento total entre 10 a 14 mm e peso médio de 0,02 g (Amorim, 1999).

A reversão é feita em gaiola, calha ou tanque. A primeira mede normalmente 1,0 x 1,0 m² e tem profundidade de 0,8 m, ficando 0,6 m submersa e 0,2 m emersa. Sua estrutura pode ser de madeira ou de cano plástico (PVC), de 25 ou 40 mm, sendo vedada com tela de náilon, com malhas de 1 mm. A gaiola de reversão flutua com auxílio de dois canos plásticos de PVC rígido de 75 ou 100 mm vedados nas extremidades. A densidade de pós-larvas por gaiola varia de 2.000 a 5.000 m³ (Amorim, 1999; Marengoni, 1999; Zimmermann, 1999).

Em qualquer dos casos acima citados, após o tratamento hormonal, a porcentagem de machos revertidos varia de 93 a 99% (Nogueira da Silva, 1997; Amorim, 1999; Marengoni, 1999; Zimmermann, 1999).

Ultimamente, vem-se fazendo a incubação das fêmeas da tilápia do Nilo, comum e linhagem tailandesa (Afonso *et al.*, 1993; Marengoni, 1999;

Zimmermann, 1999). Para isto é usada uma pequena incubadora, semelhante à utilizada para incubação de ovos de outras espécies de peixes, feita em fibra de vidro ou em plástico e com capacidade de até 10 litros de água. As larvas nascem na incubadora e, ao se transformarem em pós-larvas, quando podem nadar, passam para uma bandeja. Em seguida, começam a receber ração com hormônio (Zimmermann, 1999).

2.5.4. Cultivos Comerciais de *O. niloticus*

Dados do Centro de Pesquisas e Extensão Pesqueira do Nordeste (CEPENE), pertencente ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), mostram que o Nordeste produziu em 1996 5.405,5 t de peixes de água doce, principalmente tilápias, sendo 3.140 t na Bahia, 883,5 t no Piauí, 387,5 t em Sergipe, 300 t em Pernambuco, 230 em Maranhão, 155,5 t em Alagoas, 150 t no Ceará, 80 t no Rio Grande do Norte e 79 t na Paraíba. Do total produzido no Nordeste, 1.499 t foram decorrentes de tilápias cultivadas (Gurgel, 1998).

Segundo Silva (1999), dados de 1996 indicavam que somente no Ceará existiam 225,7 ha de viveiros de piscicultura em operação, sendo que 184 estavam sendo construídos e 241 projetos aguardando financiamento para implantação. Existiam 151 piscicultores privados em 69 municípios. Os cultivos, na sua maioria, utilizavam machos da tilápia do Nilo e vermelha.

Silva (1998) catalogou 136 projetos de piscicultura no Ceará com potencial produtivo da ordem de 13.018,49 t / ano.

2.6. Aproveitamento dos Resíduos Industriais

Do total da captura mundial de pescado cerca de 72% são utilizados nos mercados de pescado fresco, congelado, enlatado e salgado e os 28% restantes seguem para o preparo de ração animal. As vísceras de peixes representam sérios problemas com relação à higienização dos equipamentos utilizados na indústria pesqueira, ocasionando uma baixa de produção e gastos energéticos elevados. Além disso, os resíduos liberados pela indústria, embora sejam de qualidade orgânica, causam poluição ao meio ambiente. O aproveitamento de sobras comestíveis das operações de filetagem ou de corte em postas de pescado pode reduzir os custos dos insumos, minimizar os problemas de poluição ambiental e o custo unitário das matérias-primas. Este material residual se constitui de aparas, carne escura, camarões fora do tamanho para descasque manual ou mecânico, cabeças, carcaças, vísceras e efluentes em geral (Oetterer, 1994).

O cultivo de peixe tem enfrentado um grande problema com o preço da ração que torna praticamente inviável a prática da aquicultura. Pesquisadores na área de nutrição têm procurado alternativas para elaboração de uma ração de baixo custo e de fácil acesso ao aqüicultor.

Atualmente, grupos de pesquisadores vêm desenvolvendo estudos sobre o aproveitamento de resíduos de pescado como fonte de proteína para o uso em ração animal. A fonte de proteína mais utilizada vem sendo a farinha de peixe que é um produto que exige um grande investimento de capital, envolvendo um maquinário especial e um alto consumo de energia. Além disso,

em virtude da pesca ser sazonal, o custo do peixe torna-se mais elevado e o maquinário fica sem utilização ao longo de um determinado período do ano (Andrade, 1982).

Outra alternativa do aproveitamento de resíduos da indústria pesqueira para elaboração de ração animal é o ensilado de pescado, produto este, que possui alto valor nutricional e praticamente a mesma composição da matéria-prima que o origina (Windsor & Barlow, 1984).

2.7. Ensilados

2.7.1. Informações Gerais

Os ensilados de pescado constam de uma mistura de pescado (resíduo ou inteiro) com carboidratos, tais como, farinhas de cereais, mandioca e melaço colocados em contato com uma cultura inócula de *Lactobacillus*, *Pediococcus* ou outros microorganismos produtores de ácido láctico, onde esses componentes sofrem uma digestão controlada, denominada fermentação. Esse processo, na prática, não poderá ser feita assepticamente, sendo dependente do balanço da população microbiana. Como no pescado ocorre um pequeno número de bactérias produtoras de ácido láctico, torna-se necessário a adição desses microorganismos. O número inicial de bactérias do ácido láctico deverá estar próximo de 2×10^8 células/grama e temperatura em torno de 20°C. No entanto, a 25°C necessitará de um número menor de células.

Segundo Andrade (1980), a autólise é resultado da ação de enzimas proteolíticas e enzimas que clivam ligações β -glicosídicas, havendo interligação das glicoproteínas com outros componentes. A fase líquida solúvel é rica em proteínas, porém possui baixos teores de triptofano e cistina. As enzimas musculares, e principalmente as das vísceras, promovem a liquefação durante o processamento do ensilado. Peixes inteiros desintegram-se mais rápido que os filés e há sempre no final do processo, a formação de um resíduo insolúvel, uma fase aquosa solúvel e uma fase lipídica. O resíduo insolúvel resiste à digestão enzimática, é variável com a temperatura do processo, e também resiste às enzimas vegetais, se adicionadas. Admite-se que esses sedimentos sejam basicamente glicoproteínas, uma vez que possuem a mesma composição em aminoácidos das glicoproteínas extraídas do tecido conjuntivo.

O ensilado do pescado se constitui em um produto líquido preservado pela ação de ácidos, ensilado químico; por fermentação microbiana induzida por carboidratos, ensilado biológico e pela atividade de enzimas proteolíticas que ocorrem naturalmente nos peixes e/ou adicionadas, ensilado enzimático (Raa *et al.*, 1983).

2.7.2. Ensilado Químico

Para Wignall & Tatterson (1977), ensilado químico de pescado pode ser descrito como um produto preparado por adição de ácido sobre peixes inteiros ou partes destes. A liquefação é causada por enzimas proteolíticas do peixe e é grandemente acelerada pelo ácido, que também ajuda a digerir os ossos e

impedir o desenvolvimento de bactérias putrefativas, resultando em um alimento de origem animal de alta qualidade e durabilidade de estocagem.

Stone & Hardy (1986) postularam que o ensilado ácido de pescado é produzido quando é adicionado ácido sobre peixe triturado ou resíduo de peixe. O ácido evita a deterioração bacteriana, enquanto a autólise da proteína do peixe aumenta por ação das enzimas do próprio peixe ou por enzimas adicionais oriundas de fonte vegetal ou de microorganismos.

Canonizado (1980) citou que o ensilado químico de pescado é um suplemento protéico para adicionar na alimentação animal. Este produto líquido é preservado com o uso de ácidos. O ácido provoca a quebra da proteína em pequenas unidades solúveis tornando o produto semi-líquido, e produz condições desfavoráveis ao crescimento de bactérias. Enzimas proteolíticas presentes no próprio músculo do pescado contribuem para a hidrólise por quebra dos peptídeos que não são hidrolisados pela ação do ácido e, subsequentemente, a liquefação do produto é alcançada.

Na preparação do ensilado químico, os agentes de preservação utilizados são: o ácido mineral, a mistura de ácidos orgânicos e minerais e orgânicos. A mistura de ácidos é mais recomendada do que a escolha de um único ácido, devido ao fato de alguns ácidos, como o fórmico, permitirem o crescimento de fungos, principalmente em ensilados nos quais se utiliza fonte de carboidrato, enquanto que, o ácido propiônico inibe o crescimento de fungos em concentrações de 0,2% e pH até 5,5. O mecanismo que determina a liquefação está relacionado com a função das enzimas das vísceras que se difundem pela massa e são responsáveis pela autólise. Porém, peixes

esviscerados também liquefazem na presença de enzimas dos tecidos. Durante o processamento do ensilado químico, as proteínas são hidrolisadas pelas enzimas e o nitrogênio se torna mais disponível (Oetterer, 1994).

Segundo Eggum & Strom (1981), vísceras de peixe trituradas e misturadas com ácido fórmico e ácido propiônico (1:1, p/v) sofrem autólise entre 2 a 3 dias em uma temperatura de 30°C.

Durante a ensilagem e estocagem de peixes, a liquefação ocorre principalmente através da atividade das enzimas proteolíticas e a produção de altos conteúdos de peptídios solúveis, aminoácidos livres e amônia (Batista *et al.*, 1989).

Fagbenro & Fasakin (1996) elaboraram e utilizaram um ensilado ácido biológico na alimentação do peixe *Clarias gariepinus*. O ensilado foi formulado com vísceras de aves e, posteriormente, misturado com farinha de soja na proporção de 85:15 (p/p), respectivamente. Este ensilado, posteriormente foi utilizado como proteína suplementar na alimentação do peixe em diferentes proporções (0, 15 ou 30%) tomando como base uma ração comercial. Os resultados obtidos demonstraram que não houve variações significativas no ganho de peso, na performance de crescimento, no índice de conversão alimentar, na composição da carcaça e no índice hepatossomático, indicando portanto, que o ensilado de vísceras de aves pode ser utilizada como proteína suplementar para a alimentação do referido peixe como uma alternativa da ração comercial.

Balogun *et al.* (1997) realizaram estudos de alimentação de alevinos de peixe *C. gariepinus* utilizando os seguintes tratamentos: (1) silagem química

preparada a partir de restos de peixe com a adição dos ácidos sulfúrico e fórmico; (2) silagem de soja crua misturada com restos de peixe nas proporções de 0, 20, 40, 60 e 80% e (3) uma dieta controle contendo 37,5% de proteína elaborada a base de farinha de peixe. Os autores observaram que houve um maior crescimento e utilização dos nutrientes com a dieta controle. No entanto, as dietas constituídas da silagem de soja crua misturada com restos de peixe a 40% e 60% mostraram um considerável desempenho de crescimento do peixe.

Os ácidos orgânicos (fórmico e propiônico) ou inorgânicos (sulfúrico, hidrocloreídrico) são comumente usados para ensilagem, porém são corrosivos e/ou de custo alto (Batista, 1987).

2.7.3. Ensilados Enzimático

Os tratamentos dos resíduos de alimentos com enzimas ganharam força devido às técnicas atuais de DNA recombinante, que trouxeram um impacto no custo e utilização das enzimas. As enzimas oferecem alta seletividade, processos eficientes e controláveis, são específicas e evitam o aparecimento de reações indesejáveis, exercem seu efeito em temperaturas relativamente baixas e podem ser utilizadas em baixas concentrações. As enzimas mais utilizadas no processamento de resíduos aquáticos são as proteases. A protease a ser empregada, nas proporções de 0,4 e 0,5%, é colocada em contato com o pescado pré-tratado com moagem agindo por cerca de 30 a 60

min (Oetterer, 1994), a pancreatina hidrolisou o músculo de cação *Gynglimnostoma cirroatum* após 60 minutos (Gurgel *et al.*, 2002).

A degradação enzimática do músculo a componentes solúveis pode ocorrer com maior velocidade em pH neutro e fracamente ácido do que em pH alcalino, ótimo para protease como a tripsina. O grau de degradação do músculo não é determinado simplesmente pelo nível de enzimas proteolíticas no peixe, mas pela ação conjunta de inibidores enzimáticos na faixa de pH alcalino e de enzimas específicas solubilizantes mais ativas em pH mais baixo (Gildberg & Raa, 1977).

As enzimas proteolíticas de vísceras de peixe são de maior importância em sua função de hidrolisar proteínas. Após a morte do mesmo, essas enzimas continuam ativas e são responsáveis, juntamente com as enzimas das bactérias, pela deterioração do pescado. Esse processo é lento, mas a ação proteolítica pode ser acelerada. Se o crescimento de microorganismos é contido pela mudança de pH, por exemplo, estas enzimas podem continuar ativas e produzir alterações no "flavor" e na textura (Mackie, 1982).

Segundo Mackie (1978), as enzimas proteolíticas envolvidas na digestão de peixes podem ser prontamente classificadas em quatro grupos: (a) enzimas das vísceras e do trato digestivo (tripsina, quimiotripsina e pepsina); (b) enzimas do tecido muscular (catepsina); (c) enzimas de plantas (papaína, ficina e bromelina) e (d) enzimas dos microorganismos.

Vários autores têm desenvolvido pesquisas para a obtenção de concentrados protéicos de pescado, com utilização de enzimas e biomassa comestível, dentre as quais são citadas a pancreatina, papaína e protease

p.4755 (Gurgel *et al.*, 2002), pepsina (Gildberg, 1992), protease p.4755 (Vieira *et al.*, 1995).

2.7.4. Ensilado Biológico

Além das enzimas proteolíticas endógenas, existem ainda as enzimas de origem vegetal e dos microorganismos. O valor das enzimas amaciantes de carnes e na fermentação de peixe tem sido estudado através do tempo. A bromelaína do suco de abacaxi tem sido usada para digerir peixes, enquanto que a papaína do leite do mamão e a ficina do figo são mais usadas no amolecimento de carnes.

As enzimas de origem vegetal apresentam vantagens no processamento de ensilados em relação as de outras fontes. Suas atividades ótimas ocorrem em pH aproximadamente neutro, não sendo necessário a neutralização do produto final, e em uma temperatura de até 70°C, temperatura esta considerada bem acima do limite de sobrevivência das bactérias putrefativas. Estas enzimas também têm ampla especificidade, produzindo deste modo hidrolisados com peso molecular médio relativamente baixo.

A fermentação microbiana ocorre no pescado, que é um substrato rico em proteínas e lipídeos, desde que haja uma fonte de carboidratos adicionada à biomassa. Assim, as bactérias produtoras de ácido láctico propiciarão a preservação ácida à silagem. Esse tipo de silagem, na prática não poderá ser feita assepticamente, visto que a fermentação é dependente da população microbiana. Como no pescado ocorre um pequeno número de bactérias

produtoras de ácido láctico, deve-se adicionar esses microorganismos, que serão o iniciador da fermentação. As bactérias produtoras de ácido láctico homofermentativas crescem nos substratos que são carboidratos e reduzem o pH de 4,5 para 4,0 em 48 a 50 h. Essas formas homofermentativas produzem 2 moles de ácido láctico por mol de glicose. As heterofermentativas, além do ácido láctico, produzem álcool etílico e dióxido de carbono, e também outras substâncias, como as que conferem sabor amargo ao produto, a partir da frutose (Andrade, 1980).

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

As enzimas de interesse para a hidrólise das proteínas são produzidas por microorganismos tais como: fungos (*Aspergillus oryzae*), bactérias (*Bacillus subtilis*), actinomicetes (*Streptomyces griseus*) e leveduras (*Saccharomyces ssp.*), e todas elas são potentes enzimas proteolíticas (Mackie, 1978). Portanto, a decomposição que se instala no pescado pode ser produzida por enzimas proteolíticas do próprio pescado, pela atividade bacteriana ou através da combinação dos dois processos. Segundo Oetterer de Andrade (1995), a temperatura ótima para a ação das enzimas do trato digestivo do pescado é de 35 °C e, em um teor de 20% de sal, as enzimas perdem 50% da sua atividade normal.

A dificuldade de introdução da silagem biológica, no campo se deve à falta de cultura iniciadora. Entretanto, os resíduos de pescado podem ser ensilados com sucesso utilizando uma fonte de carboidrato e a cultura inicial obtida com a fermentação de vegetais (Carneiro, 1991).

A fermentação microbiana altera a composição em proteína e cinza e provoca o decréscimo no teor de lipídeos, no índice de peróxidos e de ácido tiobarbitúrico, aumentando as bases nitrogenadas e os ácidos graxos com configuração ômega três (Oetterer, 1994).

A volatilização dos componentes nitrogenados aumenta o pH e força o microorganismo a produzir mais ácido. A produção das substâncias básicas é dependente da temperatura e não pode ser atribuída somente à atividade microbiana. A atividade proteolítica ocorre principalmente por ação das proteases de tecidos, catepsinas e, em menor grau, das proteases do tecido intestinal (Oetterer, 1994). Alguns estudos mostram interesse em aproveitar mais efetivamente a habilidade de certas culturas microbianas para secretar proteases que solubilizem biomassas aquáticas. Assim, espécies como *Bacillus megateriu*, *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas mariniglutinosas* podem produzir grande quantidade de proteases se fixadas em uma suspensão de biomassa de pescado. Os nutrientes solúveis da carne permitem que os microorganismos cresçam e liberem continuamente as enzimas no sistema (Oetterer, 1994).

Tocher *et al.* (1997) usaram um ensilado preparado a base de tecido de peixe para enriquecer a dieta de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) e de artêmias, que podem ser utilizadas na alimentação de larvas de peixes marinhos, os

quais requerem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados ω -3, particularmente o docosahexanóico (DHA; 22:6n-3). Vale salientar que, uma dieta deficiente nesses ácidos graxos induz a uma grande variedade de patologias. Os autores, ainda demonstraram, que um ensilado constituído de atum apresentou alto teor de triglicéridios e, foi particularmente efetiva em aumentar o conteúdo de DHA em rotífero. Enquanto, um outro ensilado elaborado com bacalhau mostrou um conteúdo mais baixo de lipídeos e foi efetiva em aumentar o conteúdo de DHA em náuplios de artêmia.

Fagbenro & Bello-Olusoji (1997) elaboraram um ensilado de cabeça de camarão, *Macrobrachium vollehovenii*, fermentada com *Lactobacillus plantarum*, usando como fonte de carboidratos o melão ou o amido da mandioca. Esse ensilado foi incorporado como suplemento protéico em uma dieta apresentando um alto teor de proteína, alto valor calórico e rico em aminoácidos essenciais, sendo ofertado aos peixes da espécie *Clarias gariepinus* nas formas semi-triturada e peletizada. Fagbenro *et al.* (1997) fizeram uma analogia do valor nutricional entre uma ração considerada padrão (farinha de peixe) e uma mistura de farinha de soja com ensilado na proporção de 1:1. Eles constataram que as variações nas quantidades de aminoácidos no plasma do peixe mostraram-se similares em ambas dietas. Os autores verificaram ainda, que não houve diferença no índice hepatossomático na dieta proveniente da mistura de farinha de soja com ensilados. Além disso, foi observado um baixo índice de digestibilidade, sugerindo que o *C. gariepinus*, na fase jovem, não metaboliza proteína proveniente do ensilado de peixe tão eficientemente quanto a da farinha de peixe.

FAID *et al.* (1997) elaboraram um ensilado biológico a partir de carcaças de sardinha, incluindo vísceras, cabeça e barbatana, inoculada com uma cultura composta de *Saccharomyces sp.* e *Lactobacillus plantarum* e tendo como fonte de carboidratos o melaço na proporção de 25%. Os resultados demonstraram que ao longo do desenvolvimento da ensilado houve um decréscimo no pH que permaneceu constante após obtenção do pH em torno de 4,2. Foi também demonstrado, que a análise microbiológica mostrou um rápido decréscimo de Coliformes e *Clostridium* chegando a atingir níveis muito baixos após 5-7 dias de incubação.

Yoou *et al.* (1997a) realizaram um estudo paralelo entre uma silagem ácida e outra biológica elaborada com restos do processamento de enlatamento de atum e fermentada com *L. bulgaricus* e *L. plantarum*. O ensilado ácido apresentou maiores conteúdos de umidade, lipídeos, proteínas e minerais, e menores quantidades de carboidratos e ácidos graxos poliinsaturados do que o ensilado biológico. O estudo da análise de aminoácidos nos dois ensilados mostrou predominância dos ácidos glutâmico e aspártico, leucina, glicina e alanina. O conteúdo do triptofano decresceu de 30% no ensilado químico e 5% no ensilado biológico quando comparado com a matéria crua. A concentração de vitamina B-2 mostrou-se mais elevada no fermento biológico quando comparada com a ensilado ácido. Com relação às propriedades organolépticas, durante a estocagem, a ensilado ácido apresentou uma coloração marrom esverdeada e um odor de peixe. Por outro lado, o fermento biológico desenvolveu uma cor marrom avermelhada e um sabor de produto derivado do ácido láctico. Entretanto, em um outro trabalho

relacionado ao aproveitamento de restos do processamento de atum e publicado no mesmo período por Yoou *et al.* (1997b), foi demonstrado que o pH do ensilado ácido (elaborado com restos do processamento de atum) aumentou levemente de 4,0 para 4,5, enquanto que o pH do fermentado biológico diminuiu de 5,9 para 4,0, após 42 dias de estocagem a 35 °C.

Ahmed & Mahendrakar (1997) realizaram estudos de elaboração de um ensilado biológico de vísceras de peixe da água doce, adicionando o melão em diferentes proporções (5 a 15 g melão/100 g de vísceras) como fonte de carboidratos e usando como inóculo uma cultura de ensilado pre-fermentado (CSP) também, variando suas proporções (5 a 15 g CSP/100 g de vísceras de peixe). Os autores observaram que a formulação do ensilado foi mais rápida para as misturas que continham as proporções de 7,5 g de melão/15 g de CSP e 10 g de melão/10 g de CSP. Desta forma, concluíram que o aumento na percentagem de carboidratos contribuiu de forma significativa com o aumento na velocidade de fermentação do ensilado e que ao longo do processamento do ensilado não foi detectado o crescimento de bactérias patogênicas.

2.8. Ração

2.8.1. Informações Gerais

Sabe-se que todo animal requer proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais em sua dieta, sendo que a composição desses

ingredientes varia, entre diferentes espécies e dentro de uma mesma espécie, dependendo da idade, função produtiva e condições ambientais. Os lipídeos são importantes fontes de energia, sendo os ácidos graxos essenciais para o crescimento normal e sobrevivência dos peixes. Os carboidratos são considerados de mais baixo custo na dieta humana e animal. Eles constituem o grupo de nutrientes mais controvertido dentro da alimentação dos peixes, pois apesar do fornecimento de energia, quando ausentes na dieta não provocam sintomas específicos de deficiência. Enquanto os peixes carnívoros apresentam pouca ou nenhuma habilidade de assimilação dos carboidratos, os peixes herbívoros, onívoros e planctófagos, que sintetizam no seu trato digestivo amilase e celulase, facilmente hidrolisam os carboidratos contidos nos alimentos vegetais naturais ou ingredientes de origem vegetal integrantes da ração. O peixe requer energia para o crescimento, mobilidade e reprodução. As vitaminas atuam como enzimas ou coenzimas nos processos metabólicos. O requerimento em vitaminas é afetado pelo tamanho, idade e taxa de crescimento dos peixes, estádios sexuais, fatores ambientais e inter-relacionamento entre os nutrientes (Hernandez, 1989).

A classificação das rações foi estabelecida de acordo com os valores nutricionais dos produtos, dependendo dos macronutrientes e micronutrientes existentes. Os macronutrientes são: proteína, gordura, fibra, matéria mineral, cálcio e o fósforo. Enquanto os micronutrientes são: vitaminas hidrossolúveis (complexo B e vitamina C), fatores de crescimento solúveis em água (colina e inositol), vitamina A e os microminerais (zinco, ferro, cobre, iodo e selênio). Desse modo, as rações foram classificadas em rações suplementares e

completas. As rações suplementares caracterizam-se por atender parte da demanda nutricional dos peixes em função do sistema de produção e nível de manejo empregado. Seu uso é recomendado para o cultivo em tanques escavados com baixa renovação de água e alta disponibilidade de alimento natural, como também na alimentação de peixes filtradores e onívoros nas fases iniciais.

As rações completas diferem das suplementares por atenderem a todas as demandas nutricionais dos peixes em suas diferentes fases de desenvolvimento (larvicultura, alevinagem, crescimento e engorda) em função do sistema de produção e nível de manejo empregado (criação intensiva e superintensiva).

A diferenciação entre rações suplementares e completas poderia ser feita com base nos dados de exigências nutricionais apresentadas pelo National Research Council (NRC) de 1983 e 1993 (TABELA 1).

TABELA 1 - Guia prático de macronutrientes, expressos em porcentagem, de rações completas para peixes onívoros com dados de recomendação do NRC (1993) e sugestões do Comitê de Organismos Aquáticos - COAq.

Fase	Sugestões	Faixas de valores sugeridos pelo COAq		
	do NRC	Rações para peixes onívoros		
	Recria/ Engorda	Larvicultura/ Alevinagem	Recria/ Engorda	Recria/ Engorda
Sistema de manejo		Intensivo/ Superintensivo	Intensivo	Superintensivo
Proteína	28 a 35	35 a 45	28 a 35	32 a 35
Gordura	-	3 a 8	3 a 8	3 a 8
Cinzas	3 a 8	8	8	8
Fibra	-	14	14	14
Cálcio	> 0,4	3 a 3,5	3 a 3,5	3 a 3,5
Fósforo	0,4 a 0,8	0,4 a 0,75	0,4 a 0,6	0,4 a 0,75

Fonte: FAO/FIDI (1993)

2.8.2. Macronutrientes

2.8.2.1. Proteínas e Aminoácidos

Todas as proteínas, sejam das linhagens mais antigas de bactérias, sejam das formas mais complexas de vida, são constituídas com o mesmo ubíquo conjunto de 20 aminoácidos, ligados covalentemente e são componentes essenciais para estrutura e funcionamento de todos os organismos vivos. A deficiência de aminoácidos na dieta provoca doenças.

Segundo Pezzato (1997), as proteínas correspondem aos nutrientes de máxima importância na dieta, uma vez que representam o componente associado ao crescimento do animal, além de participarem como constituintes de enzimas e hormônios.

A exigência nutricional por proteína é definida em função da qualidade mínima de aminoácidos para obtenção do crescimento máximo (NRC, 1983). Este crescimento pode ser avaliado através do ganho de peso. Em peixes, a necessidade de proteína em uma dieta também é decorrente da preferência alimentar, da fase de desenvolvimento e do sistema de manejo no qual o peixe está sendo cultivado. De maneira geral, peixes onívoros apresentam menor exigência por proteína do que peixes carnívoros.

A demanda de proteína na ração decresce em função da idade do peixe. Desse modo, peixes mais jovens necessitam de uma quantidade maior de proteínas do que os mais velhos. Este diferencial está diretamente associado com o metabolismo do animal.

Segundo a FAO/FIDI (1993), os conhecimentos adquiridos através de diversas pesquisas, de vários autores, permitiram a determinação aproximada dos requerimentos nutricionais dos peixes, cultivados de forma intensiva (TABELA 2), bem como de algumas fontes vegetal e animal de proteínas que podem ser utilizadas como ingredientes protéicos na elaboração de rações animais (TABELA 3).

Maia (1992) determinou a composição aminoacídica de peixes de água doce e obteve nas espécies *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Prochilodus scrofa* (curimatá) e *O. niloticus* (tilápia do Nilo) maiores concentrações dos ácidos glutâmico e aspártico.

Fagbenro & Bello-Olusoji (1997) prepararam um produto fermentado com *Lactobacillus plantarum* a partir de cefalotórax do camarão *Machrobrachium vollehevenii* e obtiveram um produto contendo todos os aminoácidos essenciais, porém em quantidades bastante inferiores àquelas recomendado pela FAO (1998).

Fagbenro & Fasakin (1996) elaboraram um ensilado ácido com vísceras de aves e obtiveram no produto final maiores teores de arginina, isoleucina, leucina e valina.

TABELA 2 - Requerimento mínimo dos 10 aminoácidos essenciais, na dieta e na proteína da dieta.

Aminoácidos	Requerimento mínimo na dieta (%)	Requerimento mínimo na proteína da dieta (%)
Thr	0,9	2,2
Val	1,3	3,2
Met	1,6	4,0
Ile	0,9	2,2
Leu	1,6	3,9
Phe	2,1	6,0
His	0,7	1,8
Lys	2,0	5,0
Arg	2,4	6,0
Trp	0,2	0,5

Fonte: FAO/FIDI (1993)

TABELA 3 - Composição de aminoácidos, análise proximal de algumas fontes proteicas e energia líquida disponível.

Aminoácidos (%)	Fontes proteicas				
	FP	FPM	FGM	FS	FC
Arg	5,69	5,66	2,98	7,15	6,79
His	3,20	1,86	1,62	1,93	1,51
Ile	3,90	4,41	4,21	4,66	3,50
Leu	7,25	9,08	18,82	8,22	7,06
Lys	7,41	3,51	1,94	6,28	4,62
Met	2,85	2,03	2,39	1,29	1,46
Cys	0,99	2,13	1,73	1,29	1,68
Phe	3,91	6,13	6,93	5,33	3,92
Tyr	3,22	4,29	5,62	3,78	2,81
Thr	4,70	3,99	3,44	4,09	4,07
Trp	0,93	0,63	0,40	0,49	0,68
Val	4,78	5,34	4,04	4,42	5,07
Ala	6,69	5,43	10,11	4,69	7,80
Asp/Asn	8,68	6,86	5,85	10,99	7,18
Glu/Gln	14,34	25,98	27,79	22,14	14,23
Gly	7,22	4,14	2,75	4,55	13,15
Pro	4,46	9,88	9,47	5,17	8,12
Hidroxiprolina	1,43	ND	ND	ND	5,17
Ser	3,97	4,71	5,23	5,00	5,67
Taurina	1,62	ND	ND	ND	0,70
Análise Proximal (%)					
Umidade	4,70	6,00	12,10	8,70	7,50
Proteína	67,70	52,70	65,40	45,00	70,30
Lípido	10,50	11,80	3,00	1,70	12,70
Carboidratos	1,90	15,40	13,60	18,30	2,80
Energia Líquida Disponível (Kcal/100g)					
Kcal/100g	479,00	547,00	500,00	424,00	519,00

FP = Farinha de peixe, FPM = Farinha proteica de malte, FGM = Farinha de glúten, FS= Farelo de soja, FC = Farinha de carne, ND = não determinado

Fonte: FAO/FIDI (1993)

2.8.2.2. Extrato Etéreo

Assim como as proteínas, as gorduras ou extrato etéreo são componentes importantes da ração, uma vez que exercem papel fundamental no processo de produção de energia. Além disso, são fontes de ácidos graxos e transportadores de vitaminas que são componentes fundamentais para o crescimento e desenvolvimento dos animais. Os lipídeos são importantes fontes de energia, sendo os ácidos graxos essenciais para o crescimento normal e sobrevivência dos peixes. Os ácidos graxos, presentes no corpo dos peixes, caracterizam-se por conterem numerosas ligações duplas insaturadas em sua estrutura, como por exemplo, os ácidos linoléico e linolênico.

2.8.2.3. Ácidos Graxos

Quanto a presença, ou ausência de duplas ligações entre os átomos de carbono, os ácidos graxos podem ser totalmente saturados ou conter ligações em número variável de 1 a 6, do tipo metileno (-CH₂ -) interrompida (-CH=CH-CH₂ -CH= CH₂ -). As duplas ligações nos ácidos graxos de ocorrência natural geralmente estão em configuração *cis*.

Nas TABELAS 4, 5 e 6 são encontradas as designações das famílias, posições das duplas ligações em relação à extremidade carboxila (COOH), os nomes vulgares e sistemáticos da maioria dos ácidos graxos comumente encontrados em lipídeos.

TABELA 4 - Nomenclatura dos ácidos graxos saturados.

Família	Nomes vulgares	Nomes sistemáticos
10:0	Cáprico	Ácido decanoico
11:0	n-undecílico	Ácido hendecanoico
12:0	Láurico	Ácido dodecanoico
13:0	n-tridecílico	Ácido tridecanoico
14:0	Merístico	Ácido tetradecanoico
15:0	n-pentadecílico	Ácido pentadecanoico
16:0	Palmítico	Ácido hexadecanoico
17:0	Margárico	Ácido heptadecanoico
18:0	Esteárico	Ácido octadecanoico
19:0	n-nonadecílico	Ácido nonadecanoico
20:0	Araquídico	Ácido eicosanoico
21:0	n-heneicosóico	Ácido heneicosanoico
22:0	Behênico	Ácido docosanoico
24:0	Lignocérico	Ácido tetracosanoico

Fonte: Maia (1992).

TABELA 5 - Nomenclatura dos ácidos graxos monoinsaturados.

Família	Duplas ligações	Nomes vulgares	Nomes sistemáticos
14:1 n9	5	Ácido fisetérico	Ácido-5-tetradecenóico
14:1 n5	9	Ácido miristoléico	Ácido-9-tetradecenóico
16:1 n7	9	Ácido palmitoléico	Ácido-9-hexadecenóico
18:1 n12	6	Ácido petrocelínico	Ácido-6-octadecenóico
18:1 n9	9	Ácido oléico	Ácido-9-octadecenóico
18:1 n7	11	Ácido cis-vacênico	Ácido-11-octadecenóico
20:1 n11	9	Ácido gadoléico	Ácido-9-eicosenóico
20:1 n9	11	Ácido gondóico	Ácido-11-eicosenóico
22:1 n11	11	Ácido cetoléico	Ácido-11-docosenóico
22:1 n9	13	Ácido erúcico	Ácido-13-docosenóico
24:1 n9	15	Ácido nervônico	Ácido-15-tetracosenóico

Fonte: Maia (1992).

TABELA 6 - Nomenclatura dos ácidos graxos poliinsaturados.

Família	Duplas ligações	Nomes vulgares	Nomes sistemáticos
16:2n6	7,10	-	Ácido-7,10-hexadecadienóico
18:2n6	9,12	Ácido linoléico	Ácido-9,12-octadecadienóico
20:2n9	8,11	-	Ácido-8,11-eicosadienóico
20:2n6	11,14	-	Ácido-11,14-eicosadienóico
18:3n6	6,9,12	Á. γ -linolênico	Ácido-6,9,12-octadecatrienóico
18:3n3	9,12,15	Á. α -linolênico	Ácido-9,12,15-octadecatrienóico
20:3n9	5,8,11	Á. "mead"	Ácido-5,8,11-eicosatrienóico
20:3n6	8,11,14	Á. dihomog γ -linolênico	Ácido-8,11,14-eicosatrienóico
20:3n3	11,14,17	-	Ácido-11,14,17-eicosatrienóico
18:4n3	6,9,12,15	A. morótico	Ácido-6,9,12,15-octadecatetraenóico
20:4n6	5,8,11,14	A. araquidônico	Ácido-5,8,11,14-eicosatetraenóico
22:4n6	7,10,13,16	A. adrênico	Ácido-7,10,13,16-docosatetraenóico
20:4n3	8,11,14,17	-	Ácido-8,11,14,17-eicosatetraenóico
22:4n3	10,13,16,19	-	Ácido-10,13,16,19-docosatetraenóico
20:5n3	5,8,11,14,17	A. timnodônico, EPA	Ácido-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico
22:5n3	4,7,10,13,16	A. docosapentanóico	Ácido-4,7,10,13,16-docosapentaenóico
22:5n6	7,10,13,16,19	A. clupanodônico, DPA	Ácido-7,10,13,16,19-docosapentaenóico
22:6n3	4,7,10,13,16,19	Á cervônico, DHA	Ácido-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico

Fonte: Maia (1992).

Browse & Miquel (1995) analisaram o papel dos ácidos graxos poliinsaturados no crescimento e desenvolvimento da planta *Arabidopsis* que sofreu uma mutação na bioquímica e regulação da síntese dos lipídeos. Esses mutantes foram utilizados como um sistema modelo para essa investigação e mostraram um substancial decréscimo na quantidade dos ácidos graxos 18:2 e 18:3 e um concomitante aumento de 18:1 quando comparados com plantas nativas.

Kachoury *et al.* (1995) estudaram a composição em ácido graxo de 4 variedades do óleo de oliva e observaram maior quantidade de ácido oléico e menor do ácido linoléico. Os autores sugeriram o uso desse óleo para o enriquecimento de outros óleos vegetais.

Os ácidos linoléico e α -linolênico são considerados essenciais na dieta. Em virtude da importância nutricional dos ácidos graxos na nutrição animal e suas implicações na saúde é que vários pesquisadores vêm analisando esses componentes tanto em animais como em vegetais.

Apesar de os ácidos graxos das algas de água doce não terem sido muito estudados, o pouco conhecimento existente associa a ocorrência dos ácidos graxos nas algas de água doce com a taxonomia, evolução e ecologia das espécies que dependem desses componentes (Demitisky *et al.*, 1992). Stefanov *et al.* (1996) analisaram a composição de ácidos graxos presentes nas algas do lago Sofia na Bulgária e concluíram que a principal classe lipídica encontrada foi a dos fosfolipídios, seguida da dos diacilgliceróis, triacilgliceróis, monogalactosil e digalactosil. Os principais esteróis encontrados foram o

sitosterol e o colesterol e os principais ácidos graxos foram o palmítico, linoléico e linolênico.

Os alevinos de peixes marinhos necessitam em sua alimentação de uma grande quantidade de ácidos graxos altamente insaturados, particularmente o ácido docosahexaenóico (DHA), e a deficiência desse composto induz a uma série de patologias, incluindo anomalias de comportamento. Em decorrência desse conhecimento, já existe uma demanda crescente por rações para alevinos enriquecidas com DHA para serem utilizadas como suplemento nutricional durante a fase de alevinagem (Tocher *et al.*, 1997).

Produtos ricos em DHA podem ser adquiridos de ensilados dos subprodutos de peixes. Tocher *et al.* (1997) usaram um ensilado preparado de tecidos neurais de peixes para enriquecer a alimentação de rotíferos e artêmias, cujo produto apresentou altas porcentagens de DHA e ácido eicosapentaenóico (EPA).

2.8.2.4. Cálcio e Fósforo

Os minerais cálcio e fósforo estão associados ao desenvolvimento e manutenção da estrutura do corpo do animal, bem como com diversos processos fisiológicos. De maneira geral, não são frequentes os problemas com deficiência de cálcio. Na presença de níveis inadequados deste componente na dieta, os peixes possuem a habilidade de absorvê-lo da água do ambiente de cultivo. Entretanto, o fósforo deve ser fornecido exclusivamente através do alimento (Pezzato, 1995).

2.8.2.5. Fibras

As fibras representam a porção não digestível de uma matéria-prima ou ração. Estes componentes são digestíveis somente com a ação de bactérias no trato digestório do animal. A grande maioria dos peixes não possui aptidão para aproveitar as fibras, uma vez que o excesso de material fibroso resulta em um menor aproveitamento dos nutrientes da ração pelos peixes, bem como em um aumento na produção de material fecal, o que pode afetar a qualidade da água dos alimentos de cultivo (Wilson, 1995).

2.8.3. Micronutrientes

2.8.3.1. Vitaminas e Fatores de Crescimento

As vitaminas são compostos orgânicos complexos, requeridas em pequenas quantidades para as funções de crescimento, reprodução e manutenção da saúde do animal (Schimittou, 1993). A exigência nutricional para estes compostos depende da espécie de peixe, do tamanho, velocidade de crescimento, inter-relação de nutrientes, do ambiente e das funções metabólicas (Pezzato, 1997).

As vitaminas são relativamente instáveis e a causa dessa instabilidade pode ser atribuída ao processamento, manuseio e armazenamento. Algumas vitaminas são altamente vulneráveis, enquanto outras são estáveis. As causas

da inativação das vitaminas são calor, umidade, oxidação natural, presença de agentes inibidores e perdas por lixiviação das vitaminas na água no momento da alimentação (Schimittou, 1993), sendo as mais importantes as A, B e C.

Nas TABELAS 7 e 8 estão demonstrados os requerimentos nutricionais de vitaminas requeridas pelos peixes salmão, truta e carpa (FAO/FIDI, 1993).

2.8.3.2. Microminerais

O nível de microminerais requerido pelos peixes tem sido estudado apenas para algumas espécies. Diante da falta de informações, nutricionistas vêm recomendando que as exigências para estes componentes sejam semelhantes para todas as espécies cultivadas (Wilson, 1995). De acordo com esse relato a FAO/FIDI (1993) recomendou níveis minerais na dieta de algumas espécies de peixes (TABELA 9).

Em experimentos com teste de rações na alimentação animal se faz necessário o acompanhamento do efeito das rações sobre o crescimento (comprimento total, altura e peso) e aproveitamento. Vale salientar que além do acompanhamento do desenvolvimento do peixe, torna-se necessário que seja determinado o índice de conversão alimentar das rações, ou seja, a relação entre a quantidade de ração fornecida e o ganho de peso em determinado período (Silva & Souza, 1998).

TABELA 7 - Exigências nutricionais de vitaminas, requeridas por salmões, trutas e carpas, em mg/g da dieta seca.

Vitaminas	Salmão	Truta	Carpa
Tiamina	10 - 15	10 - 12	2 - 3
Riboflavina	5 - 25	20 - 30	7 - 10
Piridoxina	10 - 20	10 - 15	5 - 10
Pantotenato	40 - 50	40 - 50	30 - 40
Niacina	150 - 200	120 - 150	30 - 50
Ácido fólico	6 - 10	6 - 10	
B-12	0,015 - 0,020		
Mioinositol	300 - 400	300 - 400	200 - 300
Colina	600 - 800		500 - 600
Biotina	1 - 1,5	1 - 1,5	1 - 1,5
Vitamina C	100 - 150	100 - 150	30 - 50
Vitamina A*		2.200 - 2.500	1.000 - 2.000
Vitamina E**	40 - 50		80 - 100
Vitamina D		1.000	

Fonte: FAO/FIDI (1993).

* Expressa em U.I.

** Requerimento dependente da quantidade de gordura insaturada na dieta.

TABELA 8 - Guia de enriquecimento vitamínico e mineral para rações completas de peixes onívoros. Dados coletados do NRC (1993) e sugestões do COAq.

	Unidade	NRC	Faixas de valores sugeridos pelo COAq.		
Fase		Recria/ Engorda	Larvicultura/ Alevinagem	Recria/ Engorda	Recria/ Engorda
Sistema de Manejo	-	-	Intensivo/ Superintensivo	Intensivo	Superintensivo
Valores de vitamina sugeridos					
Tiamina	mg/Kg	0,5 a 1	10 a 20	10	10 a 20
Riboflavina		7 a 9	20	10	20
Piridoxina		5 a 6	10	3 a 6	10
Vitamina C		50 a 100	300 a 500	100 a 200	200 a 300
Fosfocolina		400 a 800	700 a 1.000	400 a 500	500 a 1.000
Inositol		440	100 a 200	100 a 200	100 a 200
Vitamina A	UI/Kg	1.000 a 4.000	4.000 a 6.000	2.000 a 4.000	4.000 a 6.000
Cianocobalamina	µg/Kg	10	20 a 30	20 a 30	20 a 100
Valores de microminerais sugeridos					
Zinco	mg/Kg	10 a 20	50 a 150	30 a 40	50 a 150
Ferro		30 a 60	60 a 100	30 a 60	60 a 100
Cobre		3 a 5	5 a 8	3 a 5	5 a 8
Iodo		0,6 a 1,1	0,6 a 1,1	0,6 a 0,8	0,6 a 1,1
Selênio		0,25	0,1 a 0,9	0,1 a 0,3	0,1 a 0,9

TABELA 9 - Níveis de minerais recomendáveis para o cultivo de diversas espécies de peixes.

Elemento	mg/kg da dieta	Espécie
Cálcio	2.700	Tilápia do Congo
Magnésio	400 - 500	Carpa
	400	Tilápia do Congo
	500 - 700	Truta arco-iris
Fósforo	6.000 - 7.000	Carpa
	4.500 - 8.000	Bagre
	6.000	Salmão do Atlântico
	6.800	"Red sea bream"
	7.000 - 8.000	Truta arco-iris
	2.900	Tilápia do Congo
Ferro	150	"Red sea bream"
	170	Tilápia do Congo
Zinco	15 - 30	Carpa e truta
Cobre	3	Carpa e truta
Selênio	0,07 - 0,38	Truta arco-iris
Iodo	0,6 - 1,1	Salmão

Fonte: FAO/FIDI (1993)

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Elaborar um suplemento protéico para a alimentação de tilápia *O. niloticus* revertida sexualmente, a partir de resíduos da indústria pesqueira, de hortaliças e frutos inadequados para o consumo humano e do vegetal *E. crassipes*.

3.2. Específicos

Determinar as características biológicas e composição química (centesimal, aminoácidos e ácidos graxos) da folha e pecíolo de *E. crassipes*;

Elaborar fermentos biológicos utilizando hortaliças e frutos descartados pelos supermercados e como fonte de carboidrato para o crescimento bacteriano de *E. crassipes*;

Acompanhar as curvas de pH e acidez dos fermentos biológicos;

Elaborar ensilados biológicos utilizando os fermentos, citados acima, para hidrolisar carcaças de peixes e como fonte de carboidrato o vegetal *E. crassipes*;

Acompanhar as curvas de pH e acidez dos ensilados biológicos;

Analisar a composição química (centesimal, aminoácidos e ácidos graxos) dos ensilados biológicos;

Acompanhar o crescimento bacteriano durante o processamento dos ensilados;

Formular rações a partir dos ensilados e dos farelos obtidos dos vegetais soja e milho;

Analisar a composição química (centesimal, aminoácidos e ácidos graxos) das rações;

Realizar ensaios biológicos das rações e acompanhamento das curvas de crescimento (comprimento total, altura e peso) e do índice de conversão alimentar dos alevinos revertidos da tilápia do Nilo *O. niloticus* linhagem tailandesa; e

Analisar estatisticamente os dados de comprimento total, altura e peso dos alevinos revertidos de tilápia do Nilo nos ensaios biológicos.

4. MATERIAIS

4.1. Folha e Pecíolo do Vegetal *E. crassipes*

As folhas e pecíolos do vegetal *E. crassipes* foram coletados dos viveiros do Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho von Ihering do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) em Pentecoste-Ceará-Brasil.

4.2. O Mamão *Carica papaya* e o Repolho *Brassica oleracea* var *capitata*

O fruto (mamão) e a hortaliça (repolho) utilizados na elaboração dos fermentos biológicos foram fornecidos pela rede de supermercados Pão de Açúcar.

4.3. Carcaças de Pargo *Lutjanus purpureus*

As carcaças de *L. purpureus* foram fornecidas pela Empresa de Processamento do Pescado NETUNO

4.4. Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo *O. niloticus* Linhagem Tailandesa

Os alevinos revertidos de tilápia do Nilo *O. niloticus* linhagem tailandesa foram cedidos pelo Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho von Ihering (DNOCS) em Pentecoste-Ceará-Brasil.

4.5. Células Sangüíneas

Eritrócitos de coelho foram obtidos de animais adultos e saudáveis, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Eritrócitos de sangue humano dos grupos A, B e O foram obtidos do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará (HEMOCE).

Eritrócitos de sangue de galinha foram obtidos de animais saudáveis criados no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

4.6. Animais de Experimentação

Camundongos albinos suíços (18-25 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da UFC.

5. METODOLOGIA

5.1. Preparação do Extrato Total

As folhas e os pecíolos do vegetal *E. crassipes* foram macerados separadamente em presença de nitrogênio líquido. Os materiais triturados foram deixados em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 na proporção de 1:3 (p/v, *E. crassipes*: meio de extração), sob agitação por 4 horas a 4°C. Os homogenatos foram filtrados em tecido de náilon e, em seguida, centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. Os precipitados foram desprezados e os sobrenadantes obtidos, denominados de extratos totais, foram concentrados por liofilização e submetidos aos ensaios das atividades hemaglutinante e tóxica e dosagem de proteínas.

5.2. Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante nos extratos totais foram determinadas através de diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8,...) das amostras em tubos de ensaio contendo tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. A cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos de coelho, humano do grupo A, B e O e de galinha a 2%, tratados com tripsina e bromelaína na proporção de 0,1 mg/10 ml da suspensão de eritrócitos. A reação foi mantida a

37°C por 30 minutos, seguida de repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente (25°C), como descrito por Ainouz *et al.* (1992). O material foi então submetido à centrifugação a 2.000 x g por 30 segundos. A hemaglutinação foi observada macroscopicamente e expressa em unidade de hemaglutinação por ml (UH/ml).

5.3. Atividade Tóxica

A toxicidade para a folha e pecíolo de *E. crassipes* em estudo foi estimada através de injeção pela via ip. em camundongos, pesando entre 18 e 20 g, alimentados com dieta peletizada comercial (4 animais/dose), sendo considerados positivos apenas os resultados no intervalo de 24 horas. (Vasconcelos *et al.*, 1994).

5.4. Atividade Anti-trípica

O ensaio para detecção do inibidor de tripsina na folha e pecíolo de *E. crassipes* foi feito de acordo com o método de Hamerstrand *et al.* (1981). Inicialmente, foi feita a extração 1/50 (p/v) do inibidor de tripsina com NaOH 0,01 M, por 3 horas, sob agitação, sendo deixado em repouso por 30 minutos. Os sobrenadantes foram centrifugados a 1.600 x g por 5 minutos. Após centrifugação, as amostras foram incubadas por 45 minutos a 37°C, em um meio de reação que consistia em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2, contendo CaCl₂, tripsina e o substrato BAPNA. A reação foi interrompida com ácido

acético a 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. O resultado foi calculado levando-se em conta a curva padrão obtida com inibidor de tripsina de soja (SBTI) e expresso como a quantidade (mg) de tripsina inibida (UI) por grama de alga.

5.5. Elaboração dos Fermentos

Os fermentos foram elaborados segundo a metodologia de Lúpin (1983) modificando a fonte de carboidratos. Os ingredientes foram utilizados nas seguintes proporções: repolho *B. oleracea* var *capitata*, mamão *C. papaya*; folha (fermento I) ou pecíolo (fermento II) de *E. crassipes*; sal e vinagre (41%, 31%, 17%, 3% e 8%, respectivamente). Esse procedimento foi desenvolvido em condições anaeróbicas na ausência de luz à temperatura de 25°C durante um período de nove dias de incubação, sendo removidas alíquotas dos fermentos a cada 24 horas para a determinação do pH e da acidez láctica.

5.6. Elaboração dos Ensilados Biológicos

Os ensilados foram elaborados segundo a metodologia de Lúpin (1983) adicionando à fonte de carboidratos o vegetal *E. crassipes*. Inicialmente, as carcaças do pescado foram trituradas em moinho 98 BT - WEG, para obtenção da pasta protéica que foi misturada aos fermentos biológicos, farinha de trigo, folhas e/ou pecíolo de *E. crassipes* (como fonte de carboidrato), sal e vinagre nas proporções de 50%, 25%, 7,5%, 7,5%, 4% e 6%, respectivamente. Essas

misturas foram homogeneizadas com espátula de madeira, acondicionadas em baldes de plástico em condições anaeróbicas e incubadas na ausência de luz durante um período de nove dias à temperatura ambiente (25°C). Desta forma, foram obtidos cinco ensilados: (1) ensilado I, contendo como cultura de bactérias lácticas o fermento I (elaborado com folha do vegetal *E. crassipes*); (2) ensilado II, contendo o fermento II (elaborado com pecíolo do vegetal *E. crassipes*) e em ambos foram utilizados como fonte de carboidrato a farinha de trigo; (3) ensilado III, utilizando como cultura láctica o fermento I e como fonte de carboidrato uma mistura de folha do vegetal *E. crassipes* e farinha de trigo (1:1, p/p); (4) ensilado IV contendo o fermento II e utilizando como fonte de carboidrato uma mistura de pecíolo do vegetal *E. crassipes* e farinha de trigo (1:1, p/p) e (5) ensilado V, obtido da mistura dos ensilados III e IV na proporção de 1:1.

A cada 24 horas foi feita uma homogeneização e removidas alíquotas para determinação do pH e do índice de acidez em ácido láctico. Após a obtenção dos ensilados, estes foram submetidos a uma avaliação organoléptica e, em seguida, expostos ao sol, sobre uma lona plástica, por aproximadamente 20 horas descontínuas.

5.7. Determinação do Grau de Acidez Láctica

A acidez láctica foi determinada ao longo do desenvolvimento do fermento I e II e dos ensilados biológicos I, II, III e IV pelo método de titulação com uma solução básica segundo o Adolfo Lutz (1985). A titulação foi

realizada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, usando-se como indicador uma solução de fenolftaleína a 1,5%. O volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação foi multiplicado pelo fator de correção de concentração, obtido através de uma curva de calibração com uma solução de ftalato ácido de potássio 0,1 M. A concentração em ácido láctico assim obtida foi expressa em porcentagem.

5.8. Elaboração das Rações

As rações usadas eram isoprotéicas (em torno de 32% de proteína) e constaram de 4 formulações (I, II, III e controle):

Ração I - Ração elaborada com ensilado biológico III, soja, farelo de trigo e premix vitamínico, sendo as proporções determinadas pelo método quadrado de Pearson múltiplo (Pezzato, 1995);

Ração II - Ração elaborada com ensilado biológico IV, soja, farelo de trigo e premix vitamínico, sendo as proporções determinadas pelo método quadrado de Pearson múltiplo (Pezzato, 1995);

Ração III - Ração elaborada com o ensilado V, soja, farelo de trigo e premix vitamínico, sendo as proporções determinadas pelo método quadrado de Pearson múltiplo (Pezzato, 1995); e

Controle - Ração comercial da FRI-PEIXE. Esta ração é usada diariamente na alimentação dos peixes do Centro de Pesquisas Rodolpho von Ihering.

5.9. Composição Química das Folhas e Pecíolos de *E. crassipes*, dos Ensilados e das Rações.

A composição química, das folhas e pecíolos do vegetal *E. crassipes*, dos ensilados e das rações foi determinada pelas medidas dos seguintes teores: umidade, proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras, cinzas, minerais (cálcio, magnésio, fósforo e ferro) e vitamina C.

5.9.1. Determinação de Umidade

Uma quantidade suficiente da amostra (aproximadamente 1 g) foi colocada para pesagem em pesa-filtros previamente tarados e, depois, colocada para secar em estufa na temperatura de 105°C durante 12 horas. Quando retirada da estufa foi colocada no dessecador e pesada. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até a obtenção do peso constante. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em porcentagem (AOAC, 1975).

5.9.2. Determinação de Cinzas

Foram pesados aproximadamente 2 g da amostra seca em cadinhos de porcelana, previamente tarados, e submetidos à incineração em mufla a 550°C por 6 horas. As amostras foram deixadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e, em seguida, pesadas. A operação de aquecimento e

resfriamento foi repetida até obtenção do peso constante das amostras incineradas. O teor de cinzas foi calculado por diferença entre os pesos inicial e residual e expresso em porcentagem. Às cinzas obtidas foram adicionados 3 ml de uma solução de ácido clorídrico 6 M, filtradas em papel de filtro (filtração média) e transferidas para um balão volumétrico, completando o volume para 100 ml com água destilada. A solução clorídrica foi reservada para as determinações posteriores de cálcio, magnésio, fósforo e ferro (AOAC, 1975).

5.9.3. Determinação de Nitrogênio Total

O nitrogênio total presente nas amostras foi determinado pelo método de Kjeldahl (Hiller *et al.*, 1948).

Para mineralização foram utilizados 1,5 g da amostra previamente seca, sendo adicionados 30 ml de ácido sulfúrico concentrado e 10 g da mistura catalítica (0,5 g de sulfato de cobre e 9,5 g de sulfato de sódio). Após mineralização, a amostra foi diluída com água destilada para um volume de 200 ml.

A amostra mineralizada e diluída foi destilada após a adição de 100 ml de NaOH 40% e 1 g de zinco em pó. A amônia liberada no decorrer da destilação foi coletada em 50 ml de ácido sulfúrico 0,1 M contendo 3 gotas do indicador vermelho de metila. O excesso de ácido sulfúrico 0,1 M foi titulado com uma solução de NaOH 0,1 M.

Os cálculos para determinação do teor de proteína bruta (PB) foram realizados usando-se a fórmula:

$$\% \text{ PB} = \frac{V \cdot 0,14 \cdot 6,25}{\text{PA}}$$

PA

Onde:

V = volume (ml) de NaOH 0,1 M gasto na titulação

PA = peso (g) da amostra usada na digestão

5.9.4. Determinação de Lipídeos Totais

Os lipídeos totais foram determinados segundo a metodologia de Triebold (1946). Em um cartucho de papel de filtro foram pesados 1,5 g da amostra previamente seca e colocados no extrator de Soxhlet, ao qual foi adaptado um balão de 250 ml previamente tarado. A extração dos lipídeos foi procedida com hexano, durante 6 horas. Depois de eliminado o solvente, por evaporação em banho-maria rotatório, o balão com a gordura foi colocado em estufa a 105°C para evaporação total do solvente. Depois de resfriado em dessecador à temperatura ambiente, o balão foi pesado. O procedimento de aquecimento (6 horas na estufa) e resfriamento foi repetido até obtenção do peso constante. O teor de lipídeos foi calculado através da relação entre o peso do lipídeo extraído e o peso inicial da amostra sendo expresso em porcentagem.

5.9.5. Determinação de Fibras

O teor de fibras foi determinado segundo a metodologia da AOAC (1975) e constituiu na pesagem de aproximadamente 1 g da amostra previamente delipidada com hexano. O resíduo obtido foi transferido diretamente para um erlenmeyer de 500 ml com auxílio de 200 ml de ácido sulfúrico (1,25%) previamente aquecido. Esse material foi fervido em refluxo por 30 minutos, efetuando-se após este tempo uma filtração em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi lavado com água quente, até não haver mais reação ácida (testando com papel indicador de pH). O resíduo contido no papel foi transferido para o mesmo erlenmeyer de 500 ml, com auxílio de 200 ml de hidróxido de sódio (1,25%) quente, o qual foi submetido a refluxo por 30 minutos. Em seguida, foi realizada uma segunda filtração em papel de filtro quantitativo (faixa preta), previamente aquecido em estufa a 105°C por 1 hora e pesado. A seguir, o material foi lavado com água quente até não haver reação básica (testando com o papel indicador de pH), e lavado por três vezes com álcool etílico e duas vezes com éter etílico. O solvente foi deixado evaporar e o papel contendo o resíduo levado para a estufa a 105°C para secagem total, até obtenção de peso constante. O papel contendo o resíduo foi colocado em um cadinho de porcelana, previamente tarado, em mufla a 550°C, queimado em bico de Bunsen e incinerado em mufla a 550°C, efetuando-se pesagens até a obtenção de peso constante. O teor de fibras foi determinado pela fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{F \cdot 100}{PA}$$

Onde:

$$F = \{(P+F+C) - P\} - C$$

P = peso do papel

F = fibra

C = cinza, conforme determinado no ítem 4.2.2

PA = peso da amostra

5.9.6. Determinação de Cálcio

Para determinação de cálcio (AOAC, 1975), foram pipetados 25 ml da solução clorídrica (item 5.6.2) em um erlenmeyer e a esta foram adicionados 20 ml da solução de molibdato de amônio 6% e 5 ml de ácido clorídrico 10%. Em seguida, a mistura foi levada para uma chapa aquecedora a 60°C para completa precipitação do fósforo, deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado recolhido em erlenmeyer, foram adicionados 20 ml de solução tampão pH 10,0 para elevar o pH da solução que passará de uma coloração levemente amarela para incolor. Posteriormente foram acrescentados 20 ml de NaOH 4 M, 5 ml de KCN 0,1 M e 5 ml de trietanolamina 20%. O volume da solução foi levado até aproximadamente 300 ml com água destilada e, em seguida, foram adicionados algumas gotas de indicador Calcon, sendo a titulação realizada

com EDTA 0,02 M até a passagem da cor vermelha para azul intenso. O cálculo para a determinação em porcentagem de cálcio, foi realizado usando-se a fórmula:

$$\% \text{ Ca} = \frac{V \cdot F \cdot M \cdot 40 \cdot 100}{P \cdot 100}$$

Onde:

V = volume de EDTA gasto na titulação

F = fator da solução de EDTA

M = 0,02

P = peso da alíquota

5.9.7. Determinação de Fósforo

A metodologia utilizada foi segundo AOAC (1975), consistindo na transferência para um balão volumétrico (50 ml) de 5 ml ou mais (dependendo da amostra) da solução clorídrica (item 5.6.2). A esta solução, foram adicionados 1 ml de hidróxido de amônio (1:1), 2 ml de ácido nítrico (1:2) e 20 ml de solução de molibdato de vanadato de amônio (molibdato de amônio 2% e vanadato de amônio 0,1%). Para a solução de referência foram adicionados os reagentes mencionados acima, com exceção da amostra. A leitura foi realizada após 30 minutos em espectrofotômetro (FEMTO 432) a 470 nm e os

resultados comparados a uma curva padrão obtida a partir de uma solução padrão de fósforo.

5.9.8. Determinação de Ferro

O método utilizado foi segundo a metodologia da AOAC (1975). A determinação foi feita tomando-se 10 ml da solução clorídrica (descrita no item 5.6.2) para um balão volumétrico de 50 ml, sendo adicionados 1 ml de HCl concentrado, 1 ml de cloridrato de hidroxilamina 10%, 5 ml de acetato de amônio 3 M e 2 ml da solução de fenantrolina 0,1%. O volume foi completado com água destilada para 50 ml e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 510 nm (FEMTO 432), sendo o resultado comparado a uma curva padrão que foi obtida a partir de uma solução padrão de ferro.

5.9.9. Determinação de Magnésio

Para determinação de magnésio (AOAC, 1975), foram pipetados 20 ml da solução clorídrica (item 5.6.2.) e a esta adicionados 20 ml da solução de molibdato de amônio 6%, 5 ml de ácido clorídrico 10%, sendo a mistura aquecida em uma chapa aquecedora a 60°C para completa precipitação do fósforo. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado foram adicionados 20 ml de uma solução tampão constituída de hidróxido de amônio (NH₄OH) 11,4 M e cloreto de amônio (NH₄Cl) 1,2 M, pH 10, para elevar o pH da

solução, cuja coloração passa de levemente amarela para incolor. Posteriormente, foram adicionados 5 ml de KCN 0,1 M, 5 ml de trietanolamina 20% e 5 gotas de eriocromo negro T como indicador. A titulação foi realizada com EDTA 0,02 M até viragem de cor vermelha para azul.

$$\% \text{ Mg} = \frac{(V' - V) \cdot F \cdot M \cdot 24 \cdot 100}{P \cdot 100}$$

Onde:

V' = volume de EDTA gasto na titulação

V = volume de EDTA gasto na titulação de cálcio

F = fator da solução de EDTA

M = 0,02

P = peso da alíquota

5.9.10. Determinação de Vitamina C

Para determinação da vitamina C, o método utilizado foi o de Ribeau-Gayon & Peynaud (1971). O procedimento foi realizado tomando-se uma quantidade conhecida da amostra, onde foram adicionados 2 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M, 1 ml de iodeto de potássio (KI) 10%, 1 ml de amido 1% e 50 ml de água destilada. A titulação foi feita com iodato de potássio (KIO_3) 0,1 M. Os cálculos para determinação do teor de vitamina C na amostra foram realizados usando-se a fórmula:

$$\text{Vit. C (mg/100g)} = \frac{V \cdot 8,8 \cdot 100}{PA}$$

PA

Onde:

V = volume de KIO₃ 0,1 M gasto na titulação

8,8 = mg de ácido ascórbico que reagem com 1 ml KIO₃ 0,1 M

PA = peso da amostra

5.9.11. Composição em Aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos da folha e pecíolo do vegetal *E. crassipes*, dos ensilados e das rações foi realizada com o auxílio de um analisador de aminoácidos do tipo Biocrom 20 Phamacia LKB, após hidrólise das amostras em ampolas seladas sob atmosfera de nitrogênio em presença de HCl 6 M contendo 1% (m/v) de fenol a 110 °C por 24 horas e remoção do ácido clorídrico por lavagem sucessivas com água milli Q e evaporação.

5.9.12. Determinação em Ácidos Graxos

Para obtenção dos ácidos graxos livres, os lipídeos foram primeiramente saponificados como se segue: uma amostra de 0,2 ml da solução de extrato de lipídeos totais foi evaporada com nitrogênio gasoso e ressuspensa em 4 ml de NaOH metanólico 0,5 N (soda cáustica metálica) e colocados em tubos de ensaio com tampa. O processo de saponificação foi efetuado em banho-maria

a 65°C por 15 minutos, seguido de resfriamento, segundo o método de Metcalfe *et al.* (1966).

Os ésteres sódicos obtidos no processo de saponificação foram transformados em ésteres metílicos voláteis, da seguinte maneira: ao extrato de lipídeos saponificados, foram adicionados 2 ml de trifluoreto de boro metanólico (BF₃ - metanol), seguindo-se de banho-maria por 15 minutos a 65°C e resfriamento com água e gelo. Após, foram adicionados 10 ml de hexano e 2 ml de água, seguido de agitação e decantação. A fase superior contendo os ésteres metílicos foi retirada com uma pipeta Pasteur. O hexano foi evaporado com nitrogênio gasoso e os ésteres metílicos foram ressuspensos em 500 µl de clorofórmio e armazenados em congelador a -30°C até o momento de serem analisados por cromatografia de fase gasosa.

A cromatografia de fase gasosa foi feita da seguinte maneira: os ésteres metílicos, derivados de ácidos graxos, foram separados e identificados por cromatógrafo de fase gasosa de coluna capilar (coluna DB-5 dimethylpolysiloxane - 30 m x 0,25 mm id - filme 0,1), em método de gradiente de temperatura de coluna (80°C a 200°C). O tempo médio de separação dos diferentes ésteres metílicos contidos na mistura foi de aproximadamente 40 minutos. A separação e a identificação dos ésteres metílicos foram efetuadas em um cromatógrafo a gás Hewlett Packard 5890 série II, acoplado a um espectrofotômetro de massa.

5.10. Ensaio Microbiológicos

Ao longo do processamento dos ensilados biológicos foi realizada a análise microbiológica realizadas segundo AOAC (1990).

Preparação das amostras

As amostras foram preparadas usando 25 g de cada ensilado e foram ressuspensas em solução salina estéril a 0,85% (1:10, p/v) denominada diluição 10^{-1} , dessa diluição foi retirado 1 ml e transferido para um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina 0,85% e pelo método das diluições sucessivas foram preparadas as diluições necessárias.

Número Mais Provável de Coliformes Totais e Fecais

A determinação do número mais provável de coliformes totais, presentes nos ensilados, foi realizada semeando-se 1 ml de cada diluição em caldo lactosado. Em seguida, os tubos foram incubados na temperatura de 37°C por 24 h a 48 h. Dos tubos onde houve formação de gás, foram retirados inóculos, com auxílio de uma alça de platina e transferidos para os meios verde bile brilhante (BVB) e o ágar eosina sulfato de metileno.

O número mais provável de coliformes fecais foi calculado a partir dos tubos que formaram gás e aparecimento da cor rósea após adição do reativo Kovacs.

Os cálculos do NMP de coliformes totais e fecais foram estimados usando a tabela padrão de Hoskins do Laboratório Nacional de Referência Animal - LANARA - (1981)

Contagem Padrão em Placas:

Para determinação da contagem padrão em placas foram transferidos 1 ml das diluições selecionadas, para placas de Petri contendo 15 ml de ágar. As placas invertidas foram incubadas à temperatura de 37°C durante 24/48 h. Após incubação foi feita a contagem das colônias (entre 30 a 300 colônias), os dados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de ensilado.

Contagem de *Staphylococcus aureus*:

A verificação da presença de *Staphylococcus aureus* foi feita semeando 0,1 ml de cada diluição em placas contendo Ágar Baird- Parker. As placas foram incubadas a 37°C durante um período de 24/48 h. As colônias, indicadoras da presença desse microorganismo, são pretas brilhantes com halo branco opaco.

Pesquisa de *Salmonella*

Para o pré-enriquecimento do meio, adicionou-se 25 g de cada ensilado em 225 ml de caldo lactosado e incubou-se à temperatura de 37°C por 24 h. Após esse período iniciou-se o enriquecimento do meio, dessa forma, transferiu-se 1 ml desse caldo para um tubo de ensaio contendo caldo tetrationato (ao qual foi adicionado 0,1 ml da solução verde brilhante e 0,2 ml da solução de lugol) e em outro contendo caldo selenito. Os tubos contendo caldo selenito foram incubados em estufa a 37°C por 24 h e os contendo tetrationato foram incubados em banho-maria a 43°C durante 24 h. Para seleção e isolamento em ágar, os supostos microorganismos foram semeados em placas contendo BVB e ágar bismuto sulfito e incubados à temperatura de 35°C por 24 h. Em ágar verde brilhante, as colônias típicas de *Salmonella* apresentam-se incolores, rosadas, avermelhadas ou esverdeadas.

Número Mais Provável de *Vibrio parahaemolyticus*

Para realização do teste presuntivo de *V. parahaemolyticus* foram preparadas diluições dos ensilados em solução salina a 3%. Uma alíquota de 1 ml de cada diluição foi incubada em caldo teepol glicose com 3% de NaCl. Após incubação a 37°C por 15/24h, os tubos com turvação do meio foram transferidos para placas de Petri contendo ágar tiosulfato citrato sacarose sais biliares (meio de prova confirmatória), as colônias de *V. parahaemolyticus* são arredondadas com diâmetro de 2 a 3 mm e com centro verde e azul.

5.11. Ensaio Biológico de Alimentação

Os experimentos de alimentação dos alevinos de tilápia do Nilo *O. niloticus* foram desenvolvidos usando-se 16 tanques de cimento cujo diâmetro, área e volume são 140 cm, 1,54 m² e 650 l, respectivamente. O abastecimento de água foi de fluxo contínuo cuja vazão correspondeu a 650 ml/min. As condições físico-químicas da água (temperatura, pH, concentração de amônia, concentração e saturação do oxigênio dissolvido) foram estabelecidas no início e no final do experimento. Os experimentos foram conduzidos no Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolph von Ihering, localizado na cidade de Pentecostes-Ceará, distante 90 km de Fortaleza, capital do Ceará, posicionando-se a 39°15' de longitude Oeste e 03°45' de latitude Sul. A temperatura média local é de 26,8°C, sendo a máxima de 34°C e a mínima de 20,2°C. O período chuvoso se estende de janeiro a junho, sendo o restante do ano praticamente seco.

Alevinos sexualmente revertidos foram previamente submetidos a um período de adaptação de sete dias, sendo dois dias de jejum e cinco dias alimentados com uma ração comercial da FRI-PEIXE, utilizada para a alimentação de peixes na fase de alevinagem. Posteriormente os alevinos foram alimentados com as seguintes rações: ração comercial da FRI-PEIXE destinada a alimentação de alevinos (Controle), ração I (Tratamento 1), ração II (Tratamento 2) e ração III (Tratamento 3). Nos grupos, controle e tratamentos (1, 2 e 3), foram utilizados 4 tanques contendo 20 alevinos com peso inicial em

torno de 2 gramas. Quinzenalmente, foram determinados a biomassa, os valores individuais de comprimento total e altura dos indivíduos correspondentes a cada tanque. A taxa de alimentação (gramas de ração/peso médio dos animais por tanque) fornecida foi ajustada em 12, 7 e 5%, dependendo da biomassa quinzenal dos indivíduos.

As rações continham na sua composição 32% de proteína bruta e 57% de ensilados.

5.12. Análise Estatística

Os dados de crescimento (comprimento total, altura e peso), dos alevinos de tilápia do Nilo *O. niloticus* alimentados com as rações I, II, III e comercial, foram submetidos a análise de variância para um nível de significância de 5% (Ivo & Fonteles-Filho, 1997). O ganho de crescimento dos indivíduos foi calculado por diferença entre os valores médios finais e os iniciais.

6. RESULTADOS

6.1. Características Químicas e Biológicas de Folhas e Pecíolos de *E. crassipes*

6.1.1. Atividade Hemaglutinante

Os extratos totais, concentrados por liofilização, elaborados a partir da folha e do pecíolo de *E. crassipes* não mostraram atividade hemaglutinante quando em contato com eritrócitos em suspensão do sangue humano dos grupos A, B e O, de galinha e de coelho tratados com as enzimas bromelaína e tripsina.

6.1.2. Atividade Tóxica

A toxicidade para os extratos totais, concentrados por liofilização, de folha e pecíolo de *E. crassipes* através de injeção por via ip. em camundongos não foi considerada positiva, após o período de 24 horas da administração, onde os indivíduos mantiveram suas atividades normais.

6.1.3. Atividade Anti-trípica

A atividade anti-trípica na folha do vegetal *E. crassipes* apresentou uma leve inibição de 0,919 mg de tripsina/g de farinha e no pecíolo 0,912 mg de tripsina/g de farinha.

6.1.4. Composição em Aminoácidos

A composição dos resíduos de aminoácidos, em porcentagem da proteína presente na farinha de folhas e pecíolos de *E. crassipes*, está demonstrada na TABELA 10. Esses dados mostram que nas folhas são encontradas maiores quantidades dos resíduos de ácido glutâmico/glutamina (14,05%), arginina (10,19%), ácido aspártico/asparagina (8,57%), prolina (7,79%), alanina (7,41%), leucina (7,12%), lisina (6,60%) e fenilalanina (6,29%). Enquanto que, no pecíolo foram observados maiores teores de ácido glutâmico/glutamina, (15,23%), ácido aspártico (12,40%), leucina (8,49%) e alanina (6,92%). Fazendo um paralelo entre a composição de aminoácidos presentes nas folhas e pecíolos do aguapé, encontrou-se maiores concentrações de ácido glutâmico/glutamina. Pode-se também observar maiores teores de arginina nas folhas.

TABELA 10 – Composição em aminoácidos (%) em relação a porcentagem de proteína presente nas folhas e pecíolos de *Eichhornia crassipes*.

Aminoácidos	Folha	Pecíolo	Requerimento/ Peixes FAO (1993)
Ásp/Asn	8,57	12,40	ND
Thr	5,14	5,02	2,2
Ser	4,11	4,82	ND
Glu/Gln	14,05	15,23	ND
Gly	5,48	5,44	ND
Ala	7,41	5,69	ND
Cys	0,48	0,38	ND
Val	4,18	5,25	3,2
Met	0,27	0,26	4,0
Ile	5,13	4,37	2,2
Leu	7,12	8,49	3,9
Tyr	5,14	4,67	ND
Phe	6,29	5,96	6,0
His	2,67	2,25	1,8
Lys	6,60	6,21	5,0
Arg	10,19	6,13	6,0
Pro	7,79	6,18	ND
Total	100,00	100,00	

ND - Não determinado

6.1.5. Composição em Ácidos Graxos

Os resultados dos teores de ácidos graxos, em porcentagem, calculados em relação ao conteúdo total dos ácidos graxos presentes nas folhas e pecíolos de aguapé, estão dispostos na TABELA 11. Tanto nas folhas como nos pecíolos de *E. crassipes* foram detectados os ácidos hexadecanóico (16:0), octadecadienóico (18:2) e o octadecatrienóico (18:3). No entanto, nas folhas foram encontrados maiores quantidades dos ácidos octadecatrienóico (44,41%) e hexadecanóico (38,89%) e no pecíolo predominou o hexadecanóico (69,56%).

6.1.6. Composição Química Elementar.

Os resultados da análise elementar, em porcentagem, de umidade, proteínas totais, lipídeos totais, carboidratos totais, fibra, cinzas, cálcio, magnésio, ferro e vitamina C presentes nas folhas e pecíolos de aguapé estão contidos na TABELA 12. Esses dados mostram que a folha possui uma grande quantidade de proteína (21,63%) quando comparada com a quantidade encontrada no pecíolo (3,21%); os teores de lipídeos foram baixo na folha e pecíolo sendo 2,30% e 2,65%, respectivamente. O teor de carboidratos totais presente na folha de aguapé foi 54,43% e no pecíolo 64,37%. Os teores de fibra foram razoavelmente altos sendo 15,20% na folha e 19,0% no pecíolo. Além desses componentes, foram encontradas quantidades significativas de ferro e vitamina C.

TABELA 11 - Composição em ácidos graxos (%) de folhas e pecíolos de *Eichhornia crassipes*.

Nomenclatura	Simbologia	Folha	Pecíolo
		(%)	
Hexadecanóico	16:0	38,89	69,56
Ocatadecadienóico	18:2	16,71	16,17
Octadecatrienóico	18:3	44,41	14,28

TABELA 12 - Composição química elementar de folhas e pecíolos de *Eichhornia crassipes* .

Composição	Folha	Pecíolo
	(%)	
Umidade	11,25	13,19
Proteína	21,63	3,21
Lipídeos	2,30	2,65
Carboidratos totais	53,43	64,37
Fibra	15,20	19,00
Cinzas	11,39	16,58
Cálcio	2,00	1,20
Magnésio	0,70	1,20
Ferro (mg/100 g)	21,80	18,80
Vitamina C (mg/100 g)	22,00	17,10

6.2. Fermentos Biológicos

6.2.1. Grau de Acidez e pH

Os resultados das determinações do grau de acidez, em porcentagem, e das variações do pH observadas durante a produção dos fermentos biológicos, cuja fonte de carboidrato utilizada foi a folha (Fermento I) e o pecíolo (Fermento II) de *E. crassipes*, tendo como cultura láctica bactérias presentes no repolho *B. oleracea* e no mamão *C. papaya*, estão demonstrados na TABELA 13 e FIGURAS 3 e 4.

O processo de fermentação com o fermento I foi iniciado com acidez de 0,54%, atingindo um valor máximo a 2,75% no quinto dia de incubação, que correspondeu ao pH de 4,0. O fermento II foi iniciado com uma acidez láctica de 0,41%, alcançando um valor máximo de 1,53%, também no quinto dia de incubação, cujo pH foi de 3,27. Somente após o sexto dia de incubação o fermento II tornou-se estável com relação ao pH.

Os produtos finais (fermentos I e II) apresentaram odor característico de fermento e com uma textura pastosa.

TABELA 13 - Variações do grau de acidez (%) e pH desenvolvidas durante o processamento dos fermentos biológicos I e II.

Período de incubação (dias)	Fermento I		Fermento II	
	Grau de acidez (%)	PH	Grau de acidez (%)	pH
0	0,54	4,76	0,41	4,09
1	1,62	4,75	0,72	3,83
2	1,62	4,47	1,23	3,47
3	1,98	4,25	1,17	3,28
4	2,39	4,09	1,40	3,20
5	2,75	4,00	1,53	3,27
6	1,85	3,92	1,45	3,36
7	1,94	3,63	1,40	3,36
8	1,62	4,67	1,26	3,22

Fermento I - fermentação usando como fonte de carboidrato folhas de aguapé *Eichhornia crassipes* e como cultura láctica bactérias presentes no repolho.

Fermento II - fermentação usando como fonte de carboidrato pecíolos de aguapé *Eichhornia crassipes* e como cultura láctica bactérias presentes no repolho.

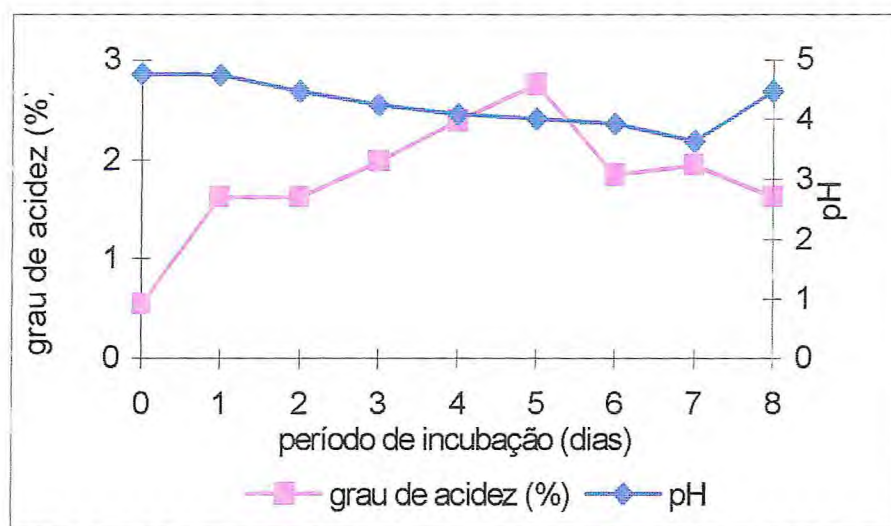


FIGURA 3 - Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do fermento biológico I.

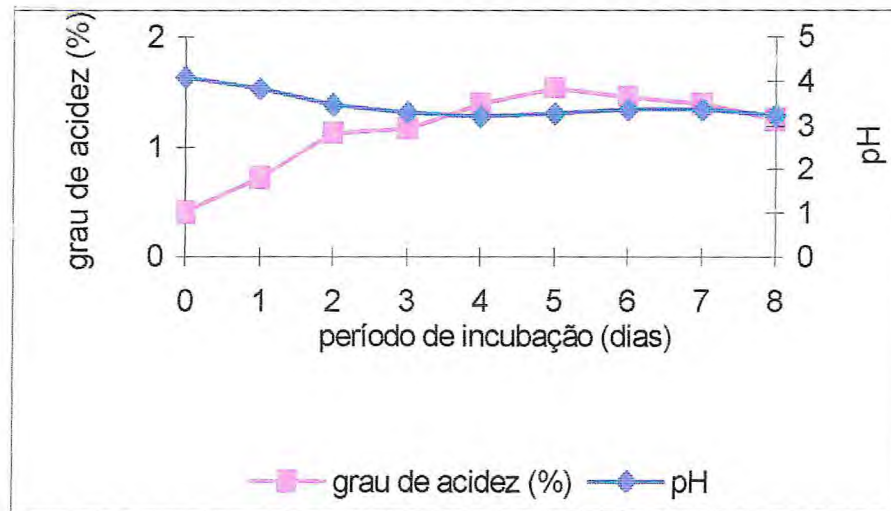


FIGURA 4 - Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do fermento biológico II.

6.3. Ensilados

6.3.1. Grau de Acidez e pH

Os resultados das variações do grau de acidez e de pH, desenvolvidas durante o processamento dos ensilados biológicos elaborados com carcaças de pargo *Lutjanus purpureus*, usando como fonte de carboidrato a farinha de trigo e como cultura láctica o fermento biológico I (denominado ensilado I) ou o fermento II (denominado ensilado II), estão demonstradas na TABELA 14 e nas FIGURAS 5 e 6.

Durante o processamento do ensilado I, a acidez apresentou até o sexto dia de incubação uma variação de 0,90 a 3,78% (FIGURA 5) e do ensilado II uma variação de 0,59 a 3,78% (FIGURA 6). O pH dos dois ensilados permaneceu inferior a 4,0. A estabilidade dos dois ensilados foi alcançada após o sexto dia de incubação.

Na TABELA 14 e FIGURAS 7 e 8 estão demonstrados os graus de acidez lácticas e pH observados durante o processamento dos ensilados III e IV. Esses dados mostram que até o sexto dia de incubação, no ensilado III, houve uma variação do grau de acidez de 0,68% a 3,41%, com o pH estabilizando-se em torno de 4,5 (FIGURA 7). A variação do grau de acidez para o ensilado IV foi iniciada com 0,72% alcançando um valor máximo de 3,69%, tendo o pH estabilizado em torno de 4,6 (FIGURA 8). Após o sexto dia tanto o ensilado III quanto o ensilado IV permaneceram estáveis quanto ao pH.

TABELA 14 - Variações do grau de acidez (%) e pH observadas durante o processamento dos ensilados I, II, III e IV.

Período de incubação (dias)	Ensilado I		Ensilado II		Ensilado III		Ensilado IV	
	Grau de acidez (%)	pH	Grau de acidez (%)	pH	Grau de acidez (%)	pH	Grau de acidez (%)	pH
0	0,90	4,86	0,59	4,88	0,68	6,20	0,72	5,94
1	1,26	5,04	1,71	4,99	0,54	6,32	0,72	6,15
2	1,85	4,72	2,48	4,32	1,04	5,91	1,12	6,36
3	2,30	4,23	3,02	4,08	1,53	5,80	1,71	5,56
4	3,10	4,09	3,02	4,04	2,61	4,65	2,01	5,48
5	3,78	3,85	3,20	3,86	2,88	4,60	2,34	5,40
6	3,78	3,95	3,78	3,88	3,41	4,52	2,52	5,33
7	3,60	3,86	3,69	3,82	4,05	4,51	2,93	4,80
8	3,55	3,93	3,65	3,88	4,46	4,50	3,42	4,60
9	3,60	3,95	3,65	3,90	4,73	4,51	3,69	4,50

Ensilado I, usando o fermento I e farinha de trigo; ensilado II, utilizando o fermento II e farinha de trigo; ensilado III, usando o fermento I e uma mistura de farinha de trigo e folhas de *E. crassipes* (1:1, p/p) e ensilado IV, usando o fermento II e uma mistura de farinha de trigo e pecíolos de *E. crassipes* (1:1, p/p).

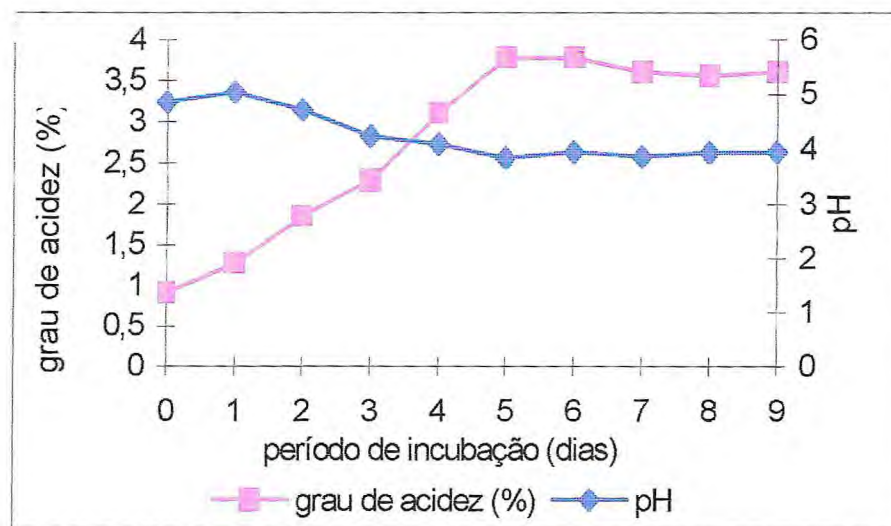


FIGURA 5 - Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado I.

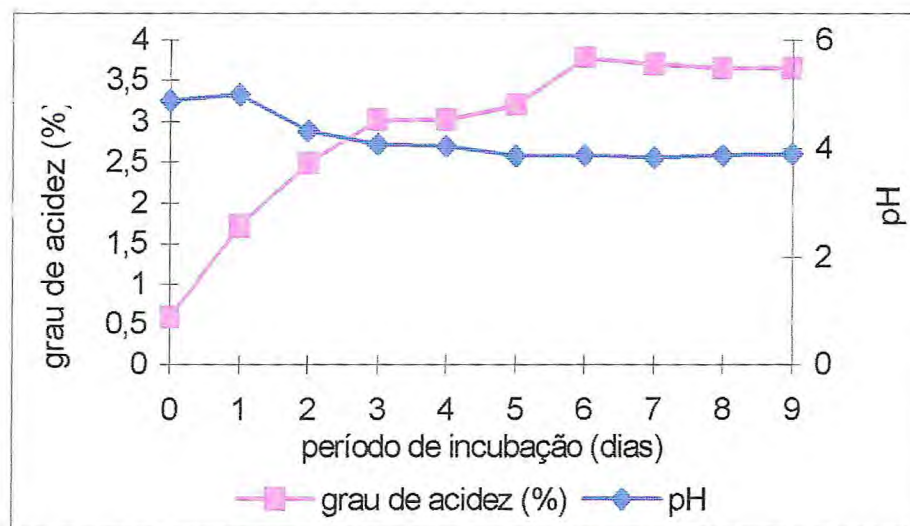


FIGURA 6 - Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado II.

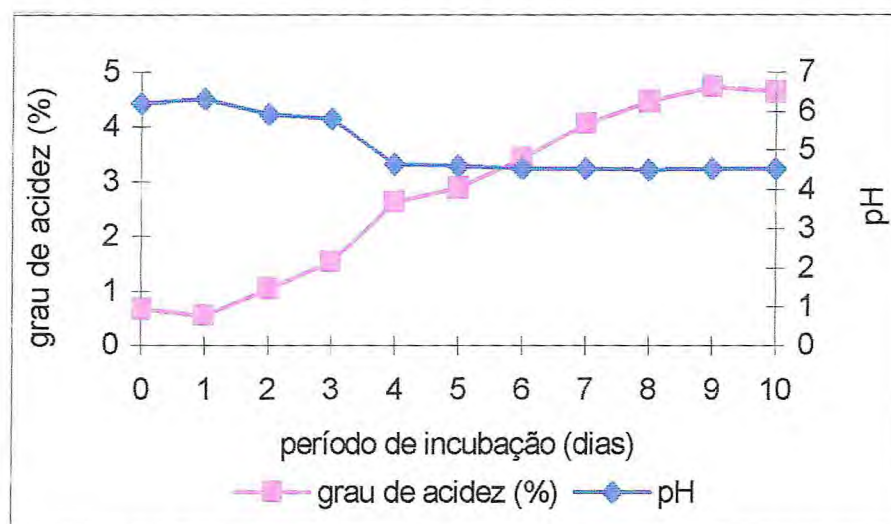


FIGURA 7 - Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado III.

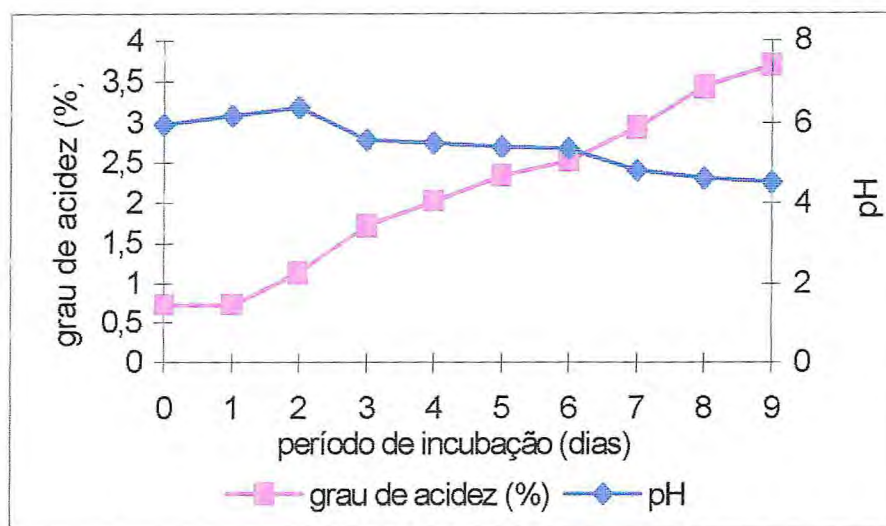


FIGURA 8 - Variação do grau de acidez (%) e pH durante o processamento do ensilado IV.

6.3.2. Variação na Composição Química Elementar dos Ensilados

As variações na composição química elementar dos ensilados I, II, III e IV estão apresentadas na TABELA 15.

Os valores de umidade no ensilado I aumentaram de 54,53 para 58,77% e os lipídeos totais de 6,96 para 8,13%, enquanto que, as cinzas e os carboidratos totais diminuíram de 9,13 e 18,57 para 7,19% e 15,00%, respectivamente. Os valores de proteína permaneceram praticamente constante (em torno de 10%).

As variações no ensilado II mostraram um decréscimo nos teores de carboidratos totais de 23,55 para 17,87%. No entanto, a umidade, lipídeos e cinzas aumentaram de 56,74, 4,92 e 4,86 para 58,18, 6,07 e 6,71%, respectivamente.

No ensilado III, o teor de umidade aumentou de 56,29 para 58,79%, enquanto que, os teores de lipídeos e carboidratos totais decresceram de 6,68 e 17,33 para 5,90 e 15,51%, respectivamente. No ensilado IV, a umidade também aumentou de 50,72 para 54,21% e os lipídeos e carboidratos totais diminuíram de 6,47 e 19,21 para 5,54% e 16,13%, respectivamente. A proteína total permaneceu praticamente constante no ensilado III (em torno de 11,5% e sofrendo uma pequena alteração no processamento do ensilado IV (de 12,10 para 13,0%).

TABELA 15 – Variações na composição elementar (%) durante o processamento dos ensilados I, II, III e IV.

Período de incubação (dias)	Umidade	Proteína total	Lipídeos	Cinzas	Carboidratos Totais
	(%)				
Ensilado I					
0	54,53	10,81	6,96	9,13	18,57
9	58,77	10,91	8,13	7,19	15,00
Ensilado II					
0	56,74	9,93	4,92	4,86	23,55
9	58,18	11,17	6,07	6,71	17,87
Ensilado III					
0	56,29	11,74	6,68	7,96	17,33
9	58,79	11,52	5,90	8,28	15,51
Ensilado IV					
0	50,72	12,10	6,47	11,50	19,21
9	54,21	13,00	5,54	11,12	16,13

Ensilado (I), usando o fermento I e farinha de trigo; ensilado (II), utilizando o fermento II e farinha de trigo; ensilado (III), usando o fermento I e uma mistura de farinha de trigo e folhas de *E. crassipes* (1:1, p/p) e ensilado (IV), usando o fermento II e uma mistura de farinha de trigo e pecíolos de *E. crassipes* (1:1, p/p).

6.3.3. Composição Química Elementar dos Ensilados Semi-secos

Os dados de composição centesimal dos ensilados III, IV e V estão na TABELA 16. Os valores dos teores de proteína para esses ensilados foram de 29,75; 29,90 e 30,20%, respectivamente. Os teores de lipídeos obtidos mostraram valores de 6,20; 5,50 e 5,25, respectivamente. A porcentagem de fibras foi baixa, principalmente, no ensilado V (0,40%), nos ensilados III e IV foram de 2,4 e 1,1%, respectivamente. Os ensilados III e IV mostraram altas quantidades de cinzas, 25,10 e 29,90, respectivamente, enquanto que, no ensilado V 14,30%. A quantidade de cálcio encontrada para os ensilados III, IV e V foi de 4,3; 4,0 e 1,2%, respectivamente. A porcentagem de magnésio obtida nos ensilados variou de 0,10 a 0,30%. As concentrações em vitaminas C variaram de 21,90 a 30,70 mg/100 g. A quantidade de ferro foi maior no ensilado III (34,30 mg/100 g).

TABELA 16 - Composição elementar dos ensilados semi-secos III, IV e V.

Composição	Ensilados		
	III	IV (%)	V
Umidade	13,50	13,80	13,90
Proteína	29,75	29,90	30,20
Lipídeos	6,20	5,50	5,25
Fibra	2,40	1,10	0,40
Cinzas	25,10	29,90	14,30
Cálcio	4,30	4,00	1,20
Magnésio	0,20	0,30	0,10
Vitamina C mg/100g	24,10	30,70	21,90
Ferro mg/100g	34,30	12,90	11,60

Ensilado III, usando o fermento I e uma mistura de farinha de trigo e folha de *E. crassipes* (1:1, p/p); ensilado IV, usando o fermento II e uma mistura de farinha de trigo e pecíolos de *E. crassipes* (1:1, p/p) e ensilado V, uma mistura dos ensilados III e IV (1:1, p/p).

6.3.4. Composição em Aminoácidos

Os resultados referentes aos teores de aminoácidos presentes nos ensilados III, IV e V estão expostos na TABELA 17 e mostram, no ensilado III, maiores porcentagens do ácido glutâmico/glutamina (13,83%), alanina (10,43%), glicina (9,79%), prolina (8,46%), ácido aspártico/asparagina (7,81%), lisina (7,61%) e leucina (7,28%); no ensilado IV, as maiores porcentagens encontradas foram do ácido glutâmico/glutamina (15,90%), alanina (9,85%), prolina (9,29%), aspártico/asparagina (9,01%), glicina (9,13%), lisina (7,25%) e arginina (6,10%); no ensilado V foi observado maiores porcentagens do ácido glutâmico/glutamina (15,58%), prolina (13,50%), arginina (10,50%), glicina (9,06%), aspártico/asparagina (8,17%), alanina (7,85%) e lisina (6,56%).

6.3.5. Composição em Ácidos Graxos

A composição em ácidos graxos, presentes nos ensilados III, IV e V, está apresentada na TABELA 18, na qual observa-se que os ácidos tetranóico (14:0), pentanóico (15:0), hexadecanóico (16:0), hexadecenóico (16:1), heptadecanóico (17:0), ácido octadecanóico (18:0) e o octadecenóico (18:1) estão presentes nos 3 ensilados, enquanto que, o ácido octadecadienóico (18:2) está presente somente nos ensilados IV e V.

No ensilado III foram encontrados maiores porcentagens dos ácidos hexadecanóico (43,72%), octadecanóico (17,02%) e octadecenóico (22,16%).

O ensilado IV contém maiores proporções dos ácidos hexadecanóico (34,49%), octadecanóico (12,53%), octadecenóico (17,87%) e octadecadienóico (22,68%). O ensilado V apresentou maiores porcentagens dos ácidos hexadecanóico (37,14%), octadecanóico (15,56%), octadecenóico (21,96%) e octadecadienóico (9,28%).

6.3.6. Análise Microbiológica dos Ensilados durante o Período de Incubação

As análises microbiológicas de coliformes totais, fecais e contagem padrão de bactérias em placas nos ensilados III e IV estão nas TABELAS 19 e 20.

De acordo com os dados obtidos ao longo da incubação do ensilado III foi observado que os valores do número mais provável (NMP) de coliformes totais/g variaram de 110×10^3 a $2,8 \times 10^2$ e de coliformes fecais/g de 20×10^2 a 4×10 . Os valores observados na contagem padrão em placas variaram de $14,7 \times 10^4$ a $12,4 \times 10$ Unidades formadoras de colônias (UFC)/g (TABELA 19), entretanto, após o 8º dia de incubação esses microorganismos estavam ausentes. Durante a incubação não foi detectado os microorganismos *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

No ensilado IV (TABELA 20), o NMP de coliformes totais/g iniciou-se com $9,3 \times 10^3$ col/g, e o NMP de coliformes fecais/g foi de $2,3 \times 10^3$. Após o quarto dia de incubação, o ensilado IV não apresentou esses microorganismos. No entanto, a contagem padrão em placas que inicialmente mostrou uma

TABELA 17 – Composição em aminoácidos (%) em relação a porcentagem de proteína presente nos ensilados III, IV e V.

Aminoácidos	Ensilado III	Ensilado IV (%)	Ensilado V	Requerimento/ Peixes FAO (1993)
Asp/Asn	7,81	9,01	8,17	ND
Thr	3,51	4,50	3,93	2,2
Ser	3,50	4,65	3,84	ND
Glu/Gln	13,83	15,90	15,58	ND
Gly	9,79	9,13	9,06	ND
Ala	10,43	9,83	7,85	ND
Cys	1,47	0,79	0,57	ND
Val	4,94	4,27	3,29	3,2
Met	2,00	1,76	0,84	4,0
Ile	4,37	3,07	2,83	2,2
Leu	7,28	5,06	5,82	3,9
Tyr	2,46	3,36	2,46	ND
Phe	4,79	3,86	3,60	6,0
His	1,92	2,16	1,56	1,8
Lys	7,61	7,25	6,56	5,0
Arg	5,81	6,10	10,50	6,0
Pro	8,46	9,29	13,50	ND
Total	100,00	100,00	100,00	

Ensilado III, usando o fermento I e uma mistura de farinha de trigo e folha de *E. crassipes* (1:1, p/p), ensilado IV, usando o fermento II e uma mistura de farinha de trigo e pecíolos de *E. crassipes* (1:1, p/p) e o ensilado V, uma mistura dos ensilados III e IV (1:1, p/p). ND - Não determinado

TABELA 18 - Composição em ácidos graxos (%) presentes nos ensilados III, IV e V.

Ácidos graxos	Simbologia	Ensilado III	Ensilado IV	Ensilado V
		Teor relativo	Teor relativo	Teor relativo
Tetranóico	14:0	6,23	4,60	6,03
Pentanóico	15:0	2,09	1,49	1,83
Hexadecanóico	16:0	43,72	34,49	37,14
Hexadecenóico	16:1	5,87	4,35	5,75
Heptadecanóico	17:0	2,93	2,00	2,47
Octadecanóico	18:0	17,02	12,53	15,56
Octadecenóico	18:1	22,16	17,87	21,96
Octadecadienóico	18:2	-	22,68	9,28

(-) ausente

Ensilado III usando o fermento I e uma mistura de farinha de trigo e folha de *E. crassipes* (1:1, p/p), ensilado IV usando o fermento II e uma mistura de farinha de trigo e pecíolos de *E. crassipes* (1:1, p/p) e o ensilado V, uma mistura dos ensilados III e IV (1:1, p/p).

TABELA 19 – Resultado da análise microbiológica durante o processamento do ensilado III.

Período de incubação (dias)	NMP de Coliformes totais/g	NMP de Coliformes fecais/g	CPP (mesófila) UFC/g
0	110×10^3	20×10^2	$14,7 \times 10^4$
2	46×10^3	7×10^2	$3,7 \times 10^4$
4	$2,8 \times 10^2$	4×10	$12,4 \times 10$
10	-	-	-

Ensilado III, usando o fermento I e uma mistura de farinha de trigo e folha de *E. crassipes* (1:1, p/p).

(-) Ausência de microorganismos

C. P. P. - contagem padrão de bactérias em placas.

ANVISA, Resolução RDC No. 12 de 02/01/2001.

TABELA 20 – Resultado da análise microbiológica durante o processamento do ensilado IV.

Período de incubação (dias)	NMP de Coliformes totais/g	NMP de Coliformes fecais/g	C PP (mesófila) UFC/g
0	$9,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$24,4 \times 10^5$
2	$9,3 \times 10^3$	4×10^2	$3,7 \times 10^4$
4	-	-	$26,4 \times 10^5$
10	-	-	$6,7 \times 10^5$

Ensilado IV, usando o fermento II e uma mistura de farinha de trigo e pecíolos de *E. crassipes* (1:1, p/p) e o ensilado V, uma mistura dos ensilados III e IV (1:1, p/p).

(-) Ausência de microorganismos

C. P. B. P. - contagem padrão de bactérias em palacas.

ANVISA, Resolução RDC No. 12 de 02/01/2001.

contagem de $24,4 \times 10^4$ UFC/g somente após o décimo dia mostrou-se isento dessas colônias. Os microorganismos *Salmonella sp.*, *S. aureus* e *V. parahaemolyticus* não foram encontrados nesse ensilado.

6.3.7. Avaliação Sensorial

O ensilado III apresentou uma cor esverdeada durante todo o processamento do ensilado, um odor característico de peixe enlatado, sabor suavemente azedo e salgado e consistência pastosa fina.

O ensilado IV mostrou inicialmente uma coloração rosada e após o sexto dia de incubação passou a apresentar uma tonalidade caramelada.

6.4. Ração

6.4.1. Composição Química Elementar

Os dados da análise elementar, em porcentagem, das rações elaboradas com os ensilados de carcaça de pargo (1) usando como fonte de carboidrato uma mistura de farinha de trigo e folha de aguapé (1:1) e como cultura de microorganismo láctico o fermento biológico I (ração I); (2) usando como fonte de carboidrato farinha de trigo e pecíolo de aguapé (1:1) e como cultura de microorganismo láctico o fermento biológico II (ração II) e (3) da ração contendo uma mistura dos ensilados III e IV na proporção de 1:1 (ração III), estão contidos na TABELA 21.

TABELA 21 - Composição elementar, em porcentagem, das rações I, II e III.

Composição	Rações		
	I	II	III
	(%)		
Umidade	16,70	25,10	21,50
Proteína	33,50	32,40	31,00
Lipídeos	3,60	3,30	2,70
Fibra	3,60	3,40	3,10
Cinzas	14,50	16,15	14,80
Cálcio	2,20	2,00	2,20
Magnésio	0,20	0,25	0,20
Ferro (mg/100g)	23,60	13,80	19,30
Vitamina C (mg/100g)	17,50	34,80	34,85

Ração I, usando uma mistura de farinha de trigo e folha de aguapé (1:1), o fermento biológico I e farelos de soja e trigo.

Ração II, usando uma mistura de farinha de trigo e pecíolo de aguapé (1:1), fermento biológico II e farelos de soja e trigo.

Ração III, usando uma mistura dos ensilados III e IV na proporção de 1:1 e farelos de soja e trigo.

A porcentagem de proteína para as rações I, II e III foi de 33,50%, 32,40% e 31,00%, respectivamente. Os teores de lipídeos e fibras dessas rações foram de 3,6, 3,3 e 2,7% e 3,6, 3,4 e 3,10%, respectivamente. Os teores obtidos para os minerais inorgânicos cálcio, magnésio e ferro foram de 2,2, 2,0 e 2,2%; 0,2, 0,25 e 2,2% e 23,6, 13,8 e 19,3 mg/100g, respectivamente. A concentração de vitamina C nas rações I, II e III foi de 17,50, 34,80 e 34,85 mg/100 g, respectivamente.

6.4.2. Composição em Aminoácidos

Os resultados das análises da composição química em aminoácidos, expressa em porcentagem, presentes nas rações I, II e III estão demonstrados na TABELA 22, na qual mostra maiores porcentagens na ração I, dos aminoácidos ácido glutâmico/glutamina (13,95%), arginina (10,41%), prolina (9,27%), ácido aspártico/asparagina (8,10%), lisina (7,34%), alanina (6,24%) e leucina (6,61%). As maiores porcentagens de aminoácidos encontradas na ração II foram do ácido glutâmico/glutamina (15,09%), arginina (9,15%), prolina (8,87%), ácido aspártico/asparagina (8,59%), lisina (6,89%), leucina (6,82%), glicina (6,82%) e alanina (6,67%). A análise de aminoácidos presentes na ração III revelou maiores porcentagens do ácido glutâmico/glutamina (15,69%), arginina (9,87%), aspártico/asparagina (9,06%), leucina (8,37%), prolina (8,26%), lisina (6,77%) e glicina (6,15%).

6.4.3. Composição em Ácidos Graxos

Os resultados das análises da composição química em ácidos graxos nas rações I, II e III (TABELA 23) mostram a presença dos ácidos tetranóico (14:0), hexadecanóico (16:0), hexadecenóico (16:1), octadecanóico (18:0) e octadecenóico (18:1) em todas as rações. Entretanto, os ácidos pentanóico (15:0) e heptadecanóico (17:0) foram somente encontrados nas rações I e II e octadecadienóico nas rações II e III.

Na análise da ração I foram encontrados maiores teores dos ácidos hexadecanóico, 38,12%, octadecanóico, 14,40% e do octadecenóico, 32,06%.

A ração II apresentou maiores teores dos ácidos hexadecanóico, 36,31%, octadecanóico, 12,50%, octadecenóico, 15,60% e octadecadienóico, 24,95%.

Na ração III, os ácidos graxos encontrados em maior porcentagem foram o hexadecanóico, 33,16%, o octadecenóico, 16,75% e o octadecadienóico 31,89%.

Todas rações analisadas apresentaram teores baixos ou até mesmo ausência (ração III) dos ácidos pentanóico e heptadecanóico.

TABELA 22 – Composição em aminoácidos (%) em relação a porcentagem de proteína presente nas rações I, II e III.

Aminoácidos	Ração I	Ração II (%)	Ração III	Requerimento/ Peixes FAO (1993)
Ásp/Asn	8,10	8,59	9,06	ND
Thr	4,32	4,45	4,28	2,2
Ser	4,32	4,79	4,44	ND
Glu/Gln	13,95	15,09	15,69	ND
Gly	5,42	6,82	6,15	ND
Ala	6,24	6,67	5,63	ND
Cys	0,91	0,48	0,45	ND
Val	3,89	4,26	3,59	3,2
Met	0,68	0,76	1,05	4,0
Ile	4,71	4,05	4,68	2,2
Leu	6,61	6,82	8,37	3,9
Tyr	4,30	4,02	3,91	ND
Phe	5,97	5,43	5,26	6,0
His	3,52	2,85	2,64	1,8
Lys	7,34	6,89	6,77	5,0
Arg	10,41	9,15	9,78	6,0
Pro	9,27	8,87	8,26	ND
Total	100,00	100,00	100,00	

Ração I, usando uma mistura de farinha de trigo e folha de aguapé (1:1), o fermento biológico I e farelos de soja e trigo. Ração II, usando uma mistura de farinha de trigo e pecíolo de aguapé (1:1), fermento biológico II e farelos de soja e trigo. Ração III, usando uma mistura dos ensilados III e IV na proporção de 1:1 e farelos de soja e trigo.

ND - Não determinado

TABELA 23 - Composição em ácidos graxos (%) presentes nas rações I, II e III.

Ácidos graxos	Simbologia	Ração I	Ração II	Ração III
		Teor relativo	Teor relativo (%)	Teor relativo
Tetranóico	14:0	5,70	4,00	3,69
Pentanóico	15:0	1,87	1,26	-
Hexadecanóico	16:0	38,12	36,31	33,16
Hexadecenóico	16:1	5,44	3,70	3,40
Heptadecanóico	17:0	2,46	1,83	-
Octadecanóico	18:0	14,40	12,50	11,15
Octadecenóico	18:1	32,09	15,60	16,75
Octadecadienóico	18:2	-	24,95	31,89

Ração I, usando uma mistura de farinha de trigo e folha de aguapé (1:1), o fermento biológico I e farelos de soja e trigo.

Ração II, usando uma mistura de farinha de trigo e pecíolo de aguapé (1:1), fermento biológico II e farelos de soja e trigo.

Ração III, usando uma mistura dos ensilados III e IV na proporção de 1:1 e farelos de soja e trigo.

(-) ausente.

6.4.4. Ensaio Biológico de Alimentação

Os valores médios de comprimento total (L), altura (H) e peso médio (ω) e índice de conversão alimentar (CA) dos alevinos de tilápia *O. niloticus* alimentados com as rações I, II e III e comercial podem ser observados nas TABELAS 24, 25, 26 e 27 e FIGURAS 9, 10 e 11.

Nos ensaios realizados com a ração comercial, usada como controle, (TABELA 24), foi observado, no período de 75 dias, que o comprimento total variou de 5,0 a 14,4 cm, altura de 1,4 a 4,4 cm e o peso de 2,4 a 49,4 g.

Entretanto nos ensaios realizados com a ração I foi constatado que o comprimento total variou de 5,2 a 14,8 cm, a altura de 1,5 a 4,4 cm e o peso de 2,4 a 63,4 g (TABELA 25).

Na ração II, foram observadas variações no comprimento total de 5,1 a 14,7 cm, na altura de 1,5 a 4,4 cm e no peso de 2,3 a 61,9 g (TABELA 26).

Na ração III, o comprimento variou de 5,1 a 14,5 cm, a altura de 1,5 a 4,4 cm e o peso de 2,4 a 43,8 g, em um período de 75 dias (TABELA 27).

Os alevinos alimentados com as rações I e II atingiram o peso ideal (60 g) no final da alevinagem após 75 dias, enquanto, os alevinos alimentados com as rações controle e III, só atingiram esse peso após 90 dias.

A análise dos dados de conversão alimentar, nas rações comercial, I, II e III, mostraram valores de 1,35, 1,20, 1,20 e 1,37, respectivamente..

A análise de variância aplicada sobre os dados de comprimento total médio, altura e peso, obtidos no início e após 75 dias de alimentação com as

rações I, II, III e controle, está nas TABELAS 28, que mostra a existência de *diferença significativa de comprimento, altura e peso ao nível de 5%*.

O teste de Tukey (TABELA 29) mostrou que não havia diferença significativa entre as médias referentes aos dados de comprimento total dos alevinos de tilápia *O. niloticus* alimentados com as rações I e II quando comparados com os dados obtidos na ração comercial. Enquanto que, os dados obtidos das rações I e II são consideradas estatisticamente diferentes da ração III.

Os dados de altura e peso obtidos dos alevinos alimentados com a ração III foram considerados significativamente semelhantes aos dados daqueles alimentados com a ração comercial. As medidas de altura e peso dos alevinos alimentados com as rações III e controle são estatisticamente diferente, ao nível de 5%, das rações I e II.

TABELA 24: Ensaios de alimentação de alevinos revertidos; de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L., 1766) com a ração comercial da FRI-PEIXE para alevinos (controle).

Período (dias)	No.	L (cm)	H (cm)	\bar{w} (g)	B (g)	TA (%)	CR (g)	G (g/dia)	GA (g)	CAA (: 1)
0	20	5,0	1,4	2,4	48,0	12	0,0	0,0	0,00	0,00
15	20	7,0	2,0	6,1	122,0	10	80,6	0,2	74,00	1,09
30	20	8,9	2,6	12,8	256,0	7	170,8	0,4	208,00	1,21
45	20	10,1	3,1	18,8	376,0	7	250,9	0,4	328,00	1,53
60	20	12,5	3,7	33,1	662,0	5	368,5	1,0	614,00	1,42
75	20	14,4	4,4	49,4	988,0	4	463,4	1,1	940,00	1,42
90	19	16,2	5,1	69,8	1.326,2	-	553,3	1,2	1.278,20	1,41

No. Número de indivíduos, L Comprimento total, H Altura, \bar{w} peso médio, B Biomassa, TA Taxa de arraçoamento, CR Consumo da ração, G Ganho de peso, GA Ganho de peso acumulado, CAA Conversão alimentar aparente, Índice de conversão alimentar = 1,35.

TABELA 25: Ensaio de alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L., 1766) com a ração I.

Período (dias)	No.	L (cm)	H (cm)	ω (g)	B (g)	TA (%)	CR (g)	G (g/dia)	GA (g)	CAA (: 1)
0	20	5,2	1,5	2,4	48,0	12	0,0	0,0	0,00	0,00
15	19	7,0	2,0	5,9	112,1	10	80,6	0,2	64,10	1,26
30	19	9,1	2,7	13,7	260,3	7	156,9	0,5	212,30	1,12
45	19	11,2	3,5	24,2	459,8	7	255,1	0,7	411,80	1,20
60	19	13,0	4,1	45,3	860,7	5	450,6	1,4	812,70	1,16
75	19	14,8	4,4	63,4	1.204,6		602,5	1,2	1.156,60	1,34

No. Número de indivíduos, L Comprimento total, H Altura, ω peso médio, B Biomassa, TA Taxa de arraçoamento, CR Consumo da ração, G Ganho de peso, GA Ganho de peso acumulado, CAA Conversão alimentar aparente, Índice de conversão alimentar = 1,20

TABELA 26: Ensaio de alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L., 1766) com a ração II.

Período (dias)	No.	LM (cm)	HM (cm)	PM (g)	B (g)	TA (%)	CR (g)	GP (g/dia)	GPA (g)	CAA (: 1)
0	20	5,1	1,5	2,3	46,0	12	0,0	0,0	0,00	0,00
15	20	6,7	2,0	5,8	116,0	10	77,3	0,2	70,00	1,10
30	19	9,0	2,6	13,5	256,5	7	162,4	0,5	210,50	1,14
45	19	11,2	3,4	24,2	459,8	7	251,4	0,7	413,80	1,19
60	19	12,9	4,1	43,8	832,2	5	450,6	1,3	786,20	1,20
75	19	14,7	4,4	61,9	1.176,1		582,5	1,2	1.130,10	1,35

No. Número de indivíduos, L Comprimento total, H Altura, ω peso médio, B Biomassa, TA Taxa de arraçoamento, CR Consumo da ração, G Ganho de peso, GA Ganho de peso acumulado, CAA Conversão alimentar aparente, Índice de conversão alimentar = 1,20

TABELA 27 - Ensaios de alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L., 1766) com a ração

III.

Período (dias)	No.	L (cm)	H (cm)	ω (g)	B (g)	TA (%)	CR (g)	G (g/dia)	GA (g)	CAA (: 1)
0	20	5,1	1,5	2,4	48,0	12	0,0	0,0	0,00	0,00
15	20	6,9	2,0	6,1	122,0	10	80,6	0,2	74,00	1,09
30	19	8,7	2,5	12,8	243,2	7	170,8	0,4	195,20	1,29
45	19	10,6	3,0	18,8	357,2	7	238,3	0,4	309,20	1,58
60	19	12,4	3,5	33,1	628,9	5	350,1	1,0	580,90	1,45
75	19	14,5	4,4	43,8	832,2	4	440,2	0,7	784,20	1,63
90	19	15,7	4,8	69,8	1.326,2		466,0	1,7	1.278,20	1,30

No. Número de indivíduos, L Comprimento total, H Altura, ω peso médio, B Biomassa, TA Taxa de arraçoamento, CR Consumo da ração, G Ganho de peso, GA Ganho de peso acumulado, CAA Conversão alimentar aparente, Índice de conversão alimentar = 1,37

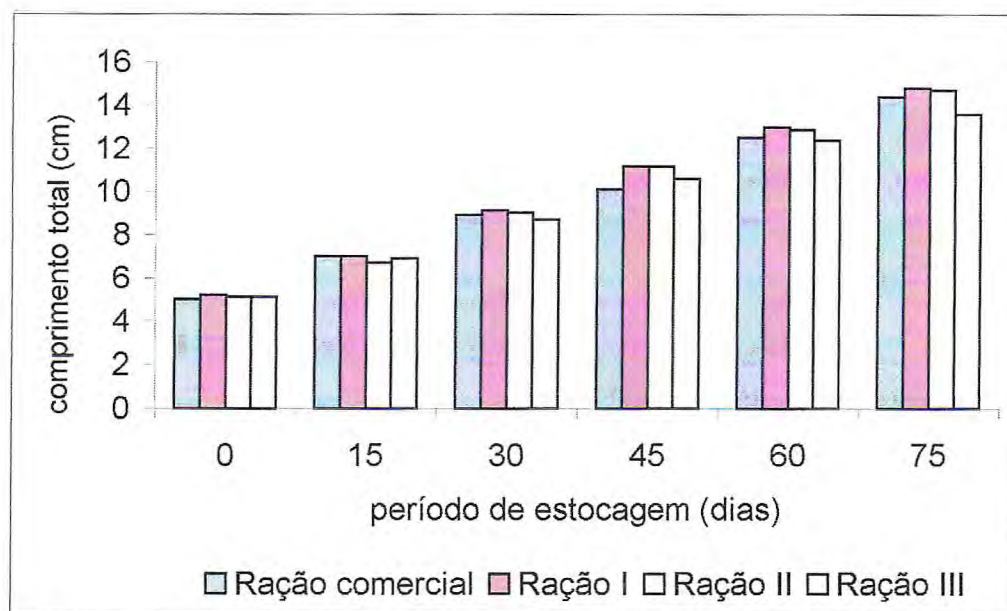


FIGURA 9 - Comprimento Total (L) médio dos alevinos de *Oreochromis niloticus* alimentados com as rações I, II, III e comercial.

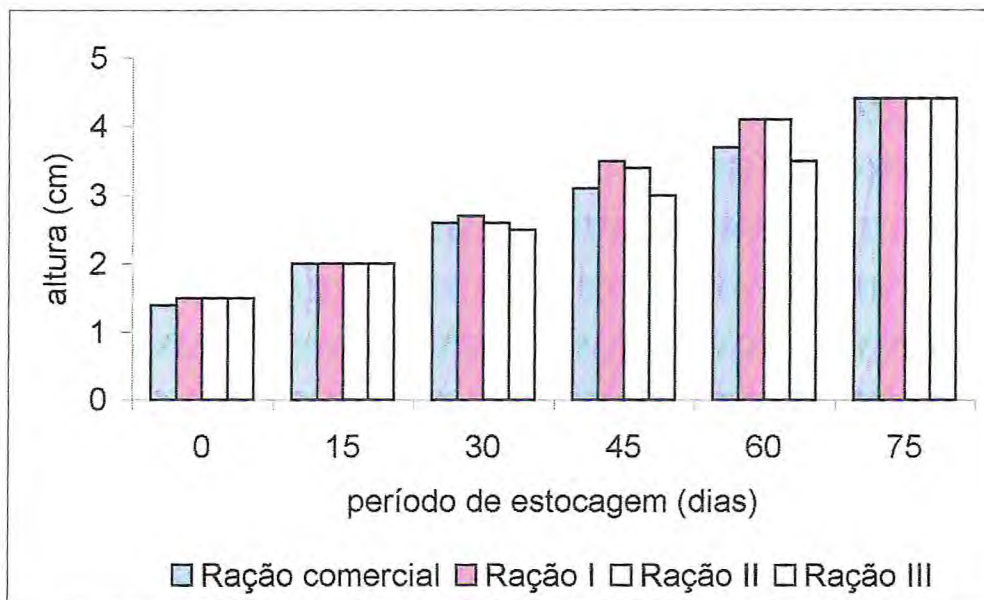


FIGURA 10 - Altura (H) dos alevinos de tilápia *Oreochromis niloticus* alimentados com as rações , I, II, III e comercial.

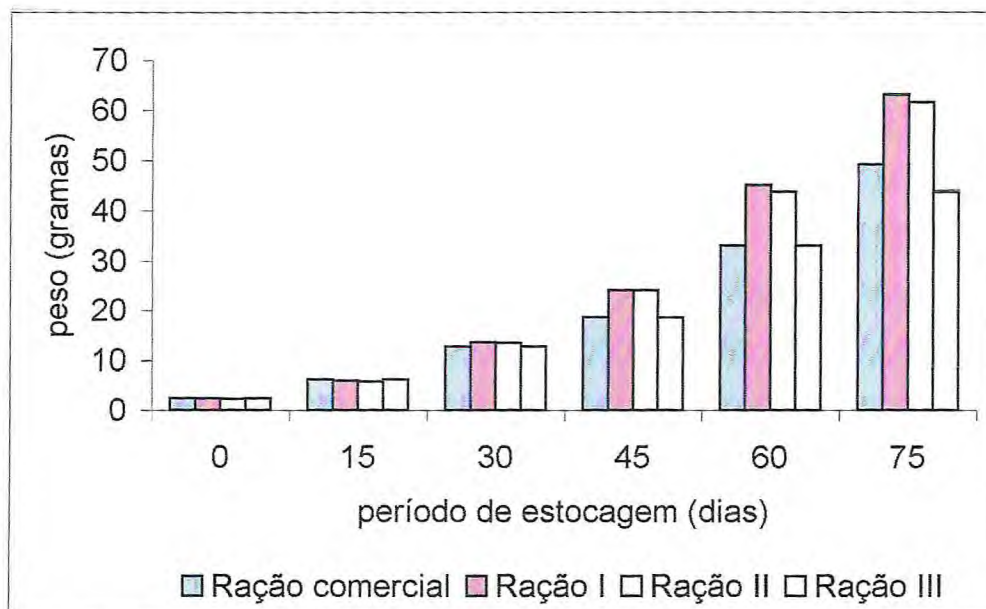


FIGURA 11 - Peso médio (\bar{w}) dos alevinos de tilápia *Oreochromis niloticus* alimentados com as rações I, II, III e comercial.

TABELA 28 - Análise de variância dos resultados de comprimento total, altura e peso dos ensaios biológicos com alevinos revertidos de tilápia (*Oreochromis niloticus*, L., 1766) - alimentados com as rações I, II, III e comercial (controle).

Causa da variação	GL	SQ	QM	F
Comprimento Total (cm)				
Varição entre	12	1,503	0,5009	
Varição dentro	3	1,033	0,0861	5,82*
Total	15	2,536		
Altura (cm)				
Varição entre	3	0,557	0,80	
Varição dentro	12	0,144	0,05	15,49*
Total	15	0,7005		
Peso (g)				
Varição entre	3	1.465,37	488,46	
Varição dentro	12	395,33	32,94	14,83*
Total	15	1.860,697		

$F_{tab_{3, 12, 0,05}} = 3,49$ G.L. = Grau de liberdade SQ = Soma dos Quadrados Médios QM = Quadrado Médio F= Coeficiente de Variação

* Fcalculado > F tabelado - rejeita-se H_0 , $H_0 \Rightarrow$ ração I = ração II = ração III = ração comercial. $H_1 \Rightarrow$ ração I \neq ração II \neq ração III \neq ração comercial.

TABELA 29 - Teste de Tukey aplicado às médias de comprimento total, altura e peso dos alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L., 1766), alimentados com as rações I, II e III e comercial (controle).

Rações	Comprimento Total (cm)	Altura (cm)	Peso (g)
I	9,595ab	2,87ab	63,48ab
II	9,592 ^a	2,89 ^a	62,09a
Controle	9,19abc	2,59c	49,63c
III	8,86c	2,46c	41,26c

Letras iguais não há diferença significativa entre as médias. Letras diferentes há diferença significativa entre as médias, para $\alpha = 0,05$

DMS_{comprimento} = 0,72 DMS_{altura} = 0,47 DMS_{peso} = 13,59

DMS = Diferença Mínima significativa

7. DISCUSSÃO

7.1. Folhas e Pecíolos de aguapé

7.1.1. Lectinas

Apesar de as lectinas ocorrerem na maioria das plantas superiores e em vários tecidos vegetais como folhas (*Agropyrum repens*, Cammue *et al.*, 1985), cascas (*Sambucus nigra*, Broekaert *et al.*, 1984), bulbos (*Galanthus nivalis*, Van Damme *et al.*, 1987), rizomas (*Aeropodium podagraria*, Peumans *et al.*, 1985), tubérculos (*Solanum tuberosus*, Allen & Neuberger, 1973) e caules (*Dolichos biflorus*, Talbot & Etzler, 1978), não foram encontradas nas folhas e pecíolos de aguapé *E. crassipes* quando os extratos totais foram submetidos aos ensaios de hemaglutinação com eritrócitos, tratados com as enzimas tripsina e bromelaína, de humanos dos grupos A, B e O, de galinha e de coelhos.

7.1.2. Atividade Anti-trípica

A atividade anti-trípica observada nas folhas e pecíolos de *E. crassipes* foi muito baixa. Benevides *et al.* (1998), analisando a atividade anti-trípica em extratos de 10 algas marinhas vermelhas, demonstraram a ausência de ação

anti-trípica em todas as algas analisadas. A ausência de atividade inibitória para tripsina também foi demonstrada para sementes de soja *Glicine max* por Vasconcelos *et al.* (1994). Embora, posteriormente, tenha sido mostrada a presença dessa atividade em extratos alcalinos de sementes de soja *Glicine max* C.V. BR-10 (Vasconcelos *et al.*, 2001). A atividade anti-trípica também foi analisada em vinte e sete espécies de algas vanezuelanas, tendo sido observada somente nos extratos totais da alga parda *Padina gymnospora* e da alga vermelha *Acanthopora spicifera* (Perez-Lorenzo *et al.*, 1998).

7.1.3. Proteínas Tóxicas

Levando-se em consideração as observações feitas pelos autores Sgarbieri (1996) e Carnovale *et al.* (1990) sobre os efeitos das toxinas, presentes nos vegetais, sobre a saúde dos animais, esse trabalho procurou detectar a possível presença de toxinas nas folhas e pecíolos de aguapé *E. crassipes*,

Embora vários autores tenham observado efeitos tóxicos em vegetais, os extratos totais das folhas e pecíolos de aguapé *E. crassipes* não apresentaram toxicidade para camundongos quando injetados intraperitonealmente. Portanto, esse vegetal em relação a toxicidade, poderá ser oferecido na alimentação animal. Resultados semelhantes foram encontrados por Benevides *et al.* (1998) quando analisaram dez espécies de algas pertencentes às famílias Rhodomelaceae, Gelidiaceae, Hypneaceae, Solieriaceae e Gracilariaceae onde não detectaram atividade tóxica no extrato

total dialisado da alga *Gelidium pusillum*.

7.1.4. Composição em Aminoácidos

A análise da composição, em porcentagem, de aminoácidos presentes na proteína total das folhas de aguapé, mostrou maiores teores dos aminoácidos ácido glutâmico/glutamina 14,05% e arginina (10,19%). O pecíolo apresentou maiores porcentagens de ácido glutâmicos/glutamina (15,23%) e ácido aspártico/asparagina (12,40%), seguidos dos hidrofóbicos leucina (8,49%) e alanina (6,92%). Diante desses resultados o aminoácido ácido glutâmico/glutamina predominou tanto nas folhas como no pecíolo de *E. crassipes*. Os aminoácidos ácidos também mostraram-se predominantes em algumas algas analisadas por Ramos *et al.* (2000).

As porcentagens de aminoácidos essenciais presentes nas folhas e pecíolos de *E. crassipes* estão acima das exigidas pela FAO/FIDI (1993), com exceção da porcentagem de metionina. Portanto, sugere-se que esse vegetal seja recomendado na alimentação de animais como suplemento protéico.

7.1.5. Composição em Ácidos Graxos

Na folhas e pecíolos de *E. crassipes* foram encontrados os ácidos graxos saturados (palmítico), diinsaturados (linoléico) e poliinsaturados (α -linolênico). No entanto, na folha obteve-se maior quantidade do ácido α -linolênico (44,41%). Enquanto que, no pecíolo o ácido graxo mais abundante

foi o palmítico (69,59%). Esses resultados estão de acordo com o esperado para tecidos clorofilados que sintetizam maiores quantidades do ácido graxo α -linolênico (Chetal *et al.*, 1982; Ferrari-Iliou *et al.*, 1984), também assemelham-se aos obtidos por Paula (1992) trabalhando com *Vigna unguiculata* L. e por Stefanov *et al.* (1996) quando analisaram os ácidos graxos presentes em algas de lagos da Bulgária.

7.1.6. Composição Elementar

A composição química elementar nas folhas de *E. crassipes* apresentou elevados teores de proteína total (21,63%) em sua composição, enquanto que, nos pecíolos a proteína foi mais baixa (3,21%). O elevado teor de proteína total encontrados nas folhas de *E. crassipes* assemelham-se a composição protéica das 10 algas vermelhas estudadas por Benevides *et al.* (1998) e da soja (FAO/FIDI,1993). Tanto nas folhas como nos pecíolos de *E. crassipes* foram encontrados altos teores de carboidratos totais.

Esses resultados sugerem um estudo mais abrangente sobre as folhas de *E. crassipes*, principalmente relacionado a sua utilização em rações para animais ou até mesmo aproveitado, de forma processada, para o consumo humano.

7.2. Fermento Biológico

Um fermento biológico láctico é composto de uma ou mais linhagens de bactérias lácticas, pertencentes ou não ao mesmo gênero ou espécie e podendo ser utilizado como inóculo de produto cru ou pasteurizado, dando início ao processo de fermentação (Santos *et al.* 1986). Os microorganismos adicionados podem ser cepas padrões ou cultivadas a partir de hortaliças, onde o repolho é um excelente meio de crescimento desses microorganismos, tendo, portanto, sido utilizado como fonte de microorganismos lácticos.

Para o crescimento das bactérias também se faz necessário uma fonte de carboidratos que no caso foi utilizado folhas ou pecíolos de *E. crassipes*.

Este estudo é de grande importância pois mostra alternativas aceitáveis para a utilização de hortaliças que são descartadas pelos supermercados, dessa forma, ocasionando um desperdício de alimento que pode ser biotransformado, retornando à população em forma indireta através da alimentação de animais domésticos.

A utilização do aguapé como fonte de carboidrato para a produção de fermentos pode ser uma alternativa para o controle do crescimento desse vegetal que tem sido considerado uma infestação nas águas de todo o planeta, principalmente nas regiões tropicais, causando sérios problemas à agricultura, aquicultura, navegação etc.

Estudos dessa natureza são necessários não somente com o aguapé como também com outros vegetais que possam ser utilizados como fonte de carboidratos. Ahmed & Mahendrakar (1996 a) prepararam um fermento

biológico usando como fonte de carboidrato o melão e obtiveram bons resultados.

7.2.1. Grau de Acidez e pH

Após 6 dias de incubação o fermento biológico II elaborado com pecíolos de aguapé atingiram sua estabilidade, ou seja, estavam em condições praticamente inalteradas com relação ao pH (em torno de 3,0). O fermento I elaborado com pecíolos de aguapé estabilizou quanto ao pH do sexto ao sétimo dia de incubação. Embora tenha sido observado um aumento na produção de ácido láctico. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Lessi *et al.* (1989) que realizaram um estudo da variação nos componentes da formulação de Lupín (1983), os autores utilizaram como fonte de carboidratos couve e amido de mandioca, e obtiveram vários fermentos cujos valores de pH variaram de 3,5 a 3,7 e de acidez láctica de 1,70 e 2,47%.

Essa acidificação do meio é resultante da transformação dos açúcares solúveis em ácidos orgânicos, como os ácidos láctico e butírico, que favorece a multiplicação das bactérias produtoras de ácido láctico e impede o desenvolvimento das bactérias putrefativas (Adams *et al.*, 1987).

7.3. Ensilados

Levando-se em consideração, os gastos com reagentes químicos e com as enzimas para elaboração de ensilados químico e enzimático, as exigências

quanto ao seu manuseio (Batista, 1987; Fagbenro & Jauncey, 1994) e o objetivo a que esse estudo se propõe, ou seja, levar alternativas para melhor e baixar o custo das rações destinadas à alimentação de alevinos de tilápia do Nilo revertidos sexualmente, utilizou-se o método de ensilado biológico, cuja fermentação foi induzida por uma cultura de bactérias obtida por fermentação. Este procedimento é de fácil manuseio podendo ser utilizado nas fazendas de grande e nas do pequeno produtor rural.

Além disso, a utilização de carcaças de peixes nos ensilados biológicos reduz a poluição ao ambiente, causada por esses resíduos. Infelizmente no Brasil não existe registros desse desperdício. No entanto, na Índia são processados cerca de 300.000 toneladas de pescado, sendo que, aproximadamente 7,5% são descartados no meio ambiente (Ahmed & Mahendrakar, 1995). Em Marrocos, segundo Sekkat, (1991), são desperdiçados enormes quantidades de restos da indústria pesqueira. Somente uma pequena parte desses resíduos tem sido aproveitada na formulação de farinha de peixe. Em contrapartida, a Índia, bem como o Brasil, possui uma porcentagem considerável de pessoas que vivem em estado de miséria.

Apesar do desperdício das carcaças de peixe como fonte potencial de proteínas (Jacob, 1974; Disney & Hoffman, 1976; Arufuddin *et al.*, 1978; Summer, 1978; Mahendrakar *et al.*, 1991; Ahmed & Mahendrakar, 1996 a, b), ainda existem problemas de saúde relacionados com a carência de proteínas. Somente no Brasil, a desnutrição atinge uma em cada três crianças menores de cinco anos (INAN, IPEA e IBGE, 1989). E informações, contidas no

"Documento de Política No. 14", O Mapa da Fome, relatam que a maioria está no Nordeste. Apesar desses dados serem conhecidos, do desenvolvimento da ciência e de toda tecnologia, a fome continua sendo um grande problema mundial.

Portanto, esse trabalho utilizou carcaças de peixe como fonte de proteínas, que poderá retornar para a população de uma forma indireta através do consumo de peixes alimentados com ensilados contendo essas carcaças.

Como o peixe inteiro (Raa & Gildberg, 1982) e os resíduos de peixe (Guirca & Levin, 1992) são pobres em carboidratos, o ensilado elaborado nesse estudo utilizou o aguapé como fonte de carboidrato para o crescimento das bactérias lácticas.

7.3.1. Grau de Acidez e pH dos Ensilados

O pH dos ensilados aumentou levemente após 24 horas de processamento. Esse aumento pode ter sido devido à liberação de NH_3 proveniente da degradação das proteínas pelas enzimas diaminaases (Arason, 1994; Ahmed & Mahendrakar, 1996 a, b).

A acidez dos ensilados I e II, cuja fonte de carboidrato utilizada foi a farinha de trigo, e a dos ensilados III e IV, cujas fontes de carboidratos foram a mistura de folha (ensilado III) ou pecíolo (ensilado IV) de aguapé com farinha de trigo (1:1 p/p), atingiram os maiores valores em 3,78, 3,78, 4,73, e 3,69%, respectivamente. E atingiram a estabilidade quanto ao pH a partir do sexto dia de incubação em condições anaeróbicas. Esses dados mostram que os

ensilados III e IV apresentaram resultados de grau de acidez melhores (III) ou equivalentes (IV) aos encontrados nos ensilados I e II. Portanto, esses dados possibilitam a escolha dos ensilados III e IV para o processamento das rações, pois, a farinha de trigo é um produto importado e de alto custo.

O pH dos ensilados I, II, III e IV estabilizou a pH entre 3,6 a 4,8. Estes resultados estão coerentes com os encontrados por Fagbenro *et al.* (1997) que utilizaram melaço como fonte de carboidrato no ensilado de cabeça do camarão *Macrobrachium vollehoveni*, e obtiveram um produto estável com pH inferior a 4,5 após 7 dias de incubação. Fagbenro & Jauncey (1994) elaboraram um ensilado de peixe contendo extrato de batata e formalina, estável a pH em torno de 4,5. Ahmed & Mahendrakar (1996 b), utilizando melaço na fermentação de carcaças de peixes, elaboraram um ensilado estável com pH variando de 4,2 e 4,5. Ainda Ahmed & Mahendrakar (1996 b), acompanhando o desenvolvimento da autólise e rancidez desenvolvidas durante um ensilado ácido (ácido propiônico) utilizando vísceras de peixes tropicais, observaram que após 3 dias o pH do meio estava em torno de 3,8. Dando continuidade a seu estudo com ensilados, Ahmed & Mahendrakar (1996 a e b) prepararam um ensilado de vísceras de peixes cuja fermentação foi induzida por uma cultura de bactérias lácticas iniciadoras e o ácido propiônico. E, mais uma vez, o pH de estabilização permaneceu em torno de 4,0.

Faid *et al.* (1997) estudaram a biotransformação dos resíduos de peixe, incluindo cabeça, nadadeiras e vísceras, onde utilizaram como fonte de carboidrato o melaço e como cultura láctica o *Lactobacillus plantarum*. Os resultados obtidos mostraram um decréscimo do pH de 6,2 para 4,5. Faid *et al.*

(1994), processando restos de peixe e acompanhando as variações no pH durante esse processo, observaram que o pH do ensilado decresceu até a faixa de 4,31. Os autores Faid *et al.* (1994) afirmaram que o pH da ensilado pode decrescer durante a primeira fase da fermentação devido ao crescimento de *L. plantarum*, e depois aumentar em decorrência da degradação das proteínas ao longo da incubação. Para Faid *et al.* (1997), o fator mais importante para controlar uma biotransformação é o pH, o qual deverá decrescer o mais rápido possível para inibir o crescimento de *Salmonella* ou de microorganismos esporulados, tais como, *Clostridium*. Além do mais, a fermentação é geralmente acompanhada por alguns metabólitos liberados pelas bactérias lácticas, que ajudam a preservar o alimento fermentado. Os autores ainda afirmam que, o aumento no grau de acidez pode ser devido a quebra dos lipídeos pelos microorganismos lipolíticos e/ou suas lipases. Esse estágio provavelmente ocorre durante os primeiros dias do processamento, onde o pH do meio ainda está na faixa neutra, dando condições dos microorganismos lipolíticos crescerem e liberarem suas lipases.

7.3.2. Composição Elementar dos Ensilados

No ensilado I houve uma leve diminuição nas porcentagens de cinzas. Resultados semelhantes foram obtidos por Dapkevicius *et al.* (1998). Fagbenro & Bello-Olusoji (1997) observaram que durante o processo do ensilado de cabeça de camarão *Machrobrachium vollehevenni* ocorreu uma redução no conteúdo de cinzas e quitina. Uma diminuição similar também foi reportada por

Meyers & Benjamin (1987) e Fox *et al.* (1994) após o processamento do ensilado de cabeça de camarão com ácido fórmico, Ahmed & Mahendrakar (1996 b) observaram um pequeno decréscimo no teor de cinzas (de 3,04 a 2,89%) durante a fermentação de vísceras de peixes tropicais, onde o teor de proteína encontrado 13,87%, foi próximo ao obtido neste estudo e permaneceu praticamente invariável durante a fermentação. Faid *et al.* (1994), trabalhando com carcaças de vários peixes encontraram teores protéicos mais baixos (10%).

Os ensilados III, IV e V foram semi-secos à temperatura de 40°C. Os teores de proteínas de 29,75, 29,90 e 30,20%, de fibra 2,40, 1,10 e 0,4% e de lipídeos 6,20, 5,50 e 5,25%, obtidos para os ensilados III, IV e V, respectivamente, estão de acordo com os aceitáveis para a alimentação animal pelo NRC (1993). Esses resultados foram semelhantes aos teores de 31,0% de proteína e 6,0% de lipídeos encontrados por Faid *et al.* (1994) e aos encontrados por Carneiro (1991) que obteve um teor de proteína de 25,30% em um ensilado de resíduos de peixe.. No entanto, os teores de lipídeos encontrados nos ensilados III,IV e V não estão coerentes com os teores lipídicos de 11,5% obtidos por Espe *et al.* (1989). Essa diferença pode ser atribuída a natureza da matéria prima, pois no presente trabalho a fermentação dos resíduos foi feita com carcaças de peixe, que possuem altas quantidades de ossos e escamas, e baixo teores de lipídeos. Além disso, Segundo Faid *et al.* (1994) podem ocorrer grandes variações no conteúdo de lipídeos (entre 0,5 e 16,3%) entre diferentes espécies de peixe.

A quantidade de vitamina C obtida nos ensilados III, IV e V (21,90 a 30,70 mg/100 g de ensilado) foram maiores do que os encontrados por Parrish *et al.* (1995) em ensilados ácidos, preparados com arenque inteiro (2 mg/100 g de ensilado).

Um alto teor de cinzas é considerado desvantajoso do ponto de vista nutritivo, principalmente no que se refere ao teor de cálcio (Nicholson *et al.*, 1995). Apesar dos elevados teores de cinzas presentes nos ensilados III e IV (25,10 e 29,90%, respectivamente), os teores de cálcio obtidos foram relativamente baixos (4,30 e 4,0%, respectivamente), melhores resultados foram obtidos na mistura dos ensilados III e IV (ensilado V, onde se obteve um teor de cinzas de 14,5% e de cálcio de 1,2%).

7.3.3. Composição em Aminoácidos

A análise dos resultados de aminoácidos em porcentagem presentes na proteína dos ensilados III e IV mostrou maiores teores do ácido glutâmico/glutamina 13,83 e 15,90%, respectivamente e de alanina correspondendo a 10,43 e 9,83%, respectivamente. No ensilado V foram observadas maiores porcentagens do ácido glutâmico/glutamina (15,58%) e prolina (13,50%). Comparando esses resultados com os valores de aminoácidos essenciais requeridos pelos peixes, demonstrados na tabela 10, observa-se que as porcentagens encontradas nos ensilados III, IV e V estão acima daquelas recomendadas pela FAO/FIDI (1993), com exceção dos teores de metionina. Esses resultados são também superiores aos encontrados em

ensilados de víscera de aves (Fagbenro & Fasakin, 1996) e aos encontrados em ensilados de peixe, usando como fonte de carboidrato batatas (Fagbenro & Bello-Olusoji (1997).

7.3.4. Composição em Ácidos Graxos

O ácido graxo oléico ocorreu em grande porcentagem nos ensilados III (22,16%), IV (17,87%) e V (21,96%). O ácido graxo linoléico (18:2) ocorreu somente nos ensilados IV (22,68%) e no V (9,28%). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Tocher *et al.* (1997), quando trabalharam com ensilados elaboradas com tecidos neurais (cabeça e olhos) do tubarão, bacalhau e atum. Os autores encontraram teores de ácido oléico em torno de 18%, e de ácido linoléico, em torno de 1%.

Dentre os ácidos graxos presentes em grandes porcentagens, o mais importante é o linoléico, pois o organismo não tem capacidade de sintetizá-lo, portanto, precisa ser fornecido através da dieta. Esse ácido graxo, bem como, o linolênico (18:3), que não foi detectado nos ensilados mas estava presente em grande quantidade (44%) nas folhas de aguapé, são compostos que dão origem a outros ácidos graxos biologicamente ativos. O ácido linoléico, através da ação das enzimas dessaturases e alongases, pode ser convertido em ácido gamalinoléico e ácido araquidônico, ambos desempenham funções importantes no início do desenvolvimento cerebral (Mahan, 1998). Devido ao fato do ácido araquidônico ser sintetizado a partir do ácido linolênico, ele passará a ser essencial se a dieta for deficiente em ácido linolênico e linoléico.

Essas famílias de ácidos graxos são também precursoras de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), compostos como hormônios que ajudam no controle da pressão sangüínea, frequência cardíaca, dilatação vascular, coagulação sangüínea, lipólise e resposta imunológica. Os sintomas da deficiência de ácido linoléico são dermatite e desenvolvimento precário em bebês alimentados com uma fórmula sem gordura. Os animais também têm insuficiência reprodutiva e fígado gorduroso (Champe & Harvey, 1997).

7.3.5. Análise Microbiológica

A mistura que deu início ao processamento do ensilado mostrou elevados NMP de coliformes totais e fecais/g de ensilado. Ahmed *et al.* (1996) também encontraram um grande número de microorganismos presentes no homogeneizado. Esse fator foi resultado das condições iniciais que se encontravam os produtos utilizados na mistura, principalmente dos repolhos e mamões que estavam em processo de deterioração.

No ensilado III, a ausência de coliformes totais e fecais foi verificada após o quarto dia de incubação e no ensilado IV após o segundo. Ao longo do período de incubação não foram detectados os microorganismos *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Esses resultados estão de acordo com a teoria defendida por Cocconcelli *et al.* (1991) que considera que o sucesso com o inoculante bacteriano láctico no processamento do ensilado depende de alguns fatores

primordiais. E o mais importante é que, o material inoculante deverá promover a diminuição das bactérias patogênicas. Duffner *et al.* (1994) concluíram que a inoculação de bactérias induz a produção de compostos lácticos que reduzem o pH do meio e, dessa forma, preservam o produto final.

Ahmed *et al.* (1996) acompanharam o desenvolvimento bacteriano durante o processamento de ensilados de vísceras de peixes de água doce e o resultado revelou uma redução no número de esporos, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*. Os coliformes e *E. coli* mostraram-se ausentes no sexto dia de fermentação e os *Enterococcus* no oitavo dia.

Ahmed & Mahendrakar (1996 b), estudando o processamento de ensilados de vísceras de peixes, observaram que após 24 horas de incubação, o ensilado estava livre de bactérias patogênicas. Faid *et al.* (1997) afirmaram que, após três dias da fermentação dos resíduos de pescado o produto estava livre de coliformes.

Faid *et al.* (1994) obtiveram um ensilado, elaborado com resíduos de pescado, cujo meio permaneceu livre de patógenos somente após o décimo dia de incubação. Eles acreditaram que, a eliminação desses microorganismos tenha sido devido à acidificação ou a algum componente, de inibição do crescimento dos microorganismos patógenos, liberado pelas bactérias produtoras de ácido láctico. Para Owens & Mendonza (1985), esse decréscimo de microorganismos patógenos é decorrente do fato de as bactérias, tais como, *Salmonella*, *Clostridium* e *Staphylococcus*, serem sensíveis a baixo pH.

7.4. Ração

7.4.1. Composição Química Elementar

As rações I, II e III apresentaram conteúdos protéicos iguais a 33,50, 32,40 e 31,0%, respectivamente. Esses valores estão próximos aos recomendados para peixes onívoros pela NRC (1993). Levando-se em conta, que a única fonte de proteína animal nessas rações seja decorrente dos ensilados, pode-se considerar esses resultados acima dos esperados. Com relação aos lipídeos totais presentes nas rações I, II e III, estes apresentaram valores abaixo do recomendável para rações, sendo, portanto, favorável a armazenagem, pois os lipídeos podem causar rancidez a ração através da oxidação dos ácidos graxos insaturados.

Teores de cinzas superiores a 14% são considerados nocivos para os animais, principalmente quando um de seus componentes, o cálcio, encontra-se em grandes quantidades. A quantidade máxima de cinzas que uma ração para peixes deve conter é de 3,5% (NRC, 1993). As rações elaboradas nesse trabalho mostraram teores de cinzas acima do recomendado (14,5 a 16%), Entretanto, os teores do mineral cálcio obtidos foram baixos (2,0 e 2,2%). Portanto, a porcentagem desse elemento está dentro do recomendado e, conseqüentemente, não deverá ocasionar danos a saúde dos peixes.

7.4.1. Composição em Aminoácidos

Os teores de aminoácidos essenciais encontrados nas rações I, II e III estão acima da porcentagem mínima requeridas pelos peixes de acordo com os dados da FAO/FIDI (1993), com exceção dos valores de metionina e fenilalanina..

7.4.1. Composição em Ácidos Graxos

As rações II e III apresentaram em sua composição grandes quantidades de ácido octadecadienóico, que é considerado essencial e precursor de outros ácidos graxos poliinsaturados que possuem função hormonal. Segundo Henderson & Tocher (1987), os alevinos de peixes marinhos necessitam de grande quantidades de ácidos graxos altamente poliinsaturados (HUFA), particularmente o docosahexaenóico, já que, sua deficiência induz a várias patologias. Portanto, o ácido octadecadienóico presente nas rações II e III é imprescindível na alimentação.

7.4.2. Ensaio Biológico de Alimentação

As rações usadas nesse estudo apresentavam em sua composição 57% de ensilados, contendo portanto, 17% a mais do utilizado por Fagbenro & Fasakin (1996) que usaram uma ração para alevinos de bagre de canal *Clarias gariepinus* contendo 40% de ensilado.

Os resultados de crescimento e ganho de peso dos alevinos de tilápia alimentados com a ração III foram semelhantes aos obtidos com a ração comercial, enquanto que, as rações I e II apresentaram ganhos de peso superiores aos obtidos na ração comercial. Parrish *et al.* (1995) relataram que salmões alimentados com ensilados de arenque obtiveram os mesmos ganhos de peso quando comparados com aqueles que receberam diferentes rações comerciais.

A aceitação na ingestão das rações, elaboradas nesse estudo, pelos alevinos de tilápia, foi excelente, os quais tornaram-se familiarizados com as rações a partir do segundo dia de alimentação. Esses resultados mostraram-se mais satisfatórios que os obtidos por Fagbenro & Fasakin (1996), que realizaram estudos de alimentação de bagres de canal com um ensilado constituído de vísceras de aves. Os autores observaram que somente após a primeira semana de alimentação os peixes tornaram-se adaptados a ração.

Nenhuma anomalia foi observada durante os 75 (experimentos I e II) ou 90 (experimentos III e controle) dias do experimento, nem mesmo características de deficiência em triptofano, pois, não foi observada nenhuma curvatura na coluna espinhal. No entanto, essa anomalia foi observada por Wee *et al.* (1986) e Edwards *et al.* (1987) quando realizaram ensaios de alimentação com alevinos de bagre de canal (*Clarias batracus* e *C. macrocephalus*) com ensilados ácidos preparados com peixe.

Pelo índice de conversão alimentar dos alevinos de tilápia do Nilo *O. niloticus* alimentados com as rações comercial (1,35), I (1,20), II (1,20) e III

(1,37), pode-se afirmar que houve um melhor desempenho na conversão alimentar com as rações I e II.

Os indivíduos alimentados com as rações I e II atingiram o peso ideal para o final da alevinagem (60,0 g) com 75 dias de experimento, enquanto que, as rações comercial e III só atingiram esse peso com 90 dias. Portanto, as rações elaboradas com os ensilados I e II apresentaram melhores ganhos de peso.

De uma maneira geral, os dados obtidos de crescimento (comprimento total, altura, peso) e conversão alimentar de alevinos de tilápia *O. niloticus* quando alimentados com as rações comercial, I, II e III, mostraram melhores resultados com os alevinos alimentados com as rações I e II.

Esses resultados estão coerentes com a característica do hábito alimentar da tilápia, que embora seja um peixe onívoro, tem preferência por alimentos vegetais. Marengoni (1999) salientou que a tilápia *O. niloticus* consome grande variedade de alimentos naturais, ajudando a controlar o grande crescimento de plantas aquáticas submersas e flutuantes e, desta forma, favorecendo o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Para Freitas & Gurgel (1984), as tilápias utilizam grandes variedades de plantas e animais aquáticos como alimento e crescem rapidamente em ambientes aquáticos ricos em nutrientes. Dando ênfase a essa questão, Anônimo (1995) afirmou que as tilápias ingerem grande variedade de alimentos naturais, incluindo plâncton e folhas verdes.

Além desse fator (preferência dos alevinos de tilápia por vegetais) a temperatura (em torno de 33°C) em que se procedeu o experimento é

considerada mais favorável para se obter melhores resultados de desenvolvimento de alevinos de tilápias tailandesas quando comparada as temperaturas de 23, 26 e 29°C, relatadas por Zimmermann (2000).

7.4.3. Análises Estatísticas

Quando os F (obtidos dos dados amostrais) da análise de variância é maior que o F tabelado significa que pelo menos uma das médias de crescimento (comprimento, altura e peso) é diferente das demais. No caso desse experimento o F calculado foi maior que o F tabelado, portanto, existe diferença significativa ao nível de 5% entre as amostras. Com esse resultado foi aplicado o Teste de Tukey para localizar as médias que diferem entre si.

O teste de Tukey mostrou que os melhores resultados obtidos durante a alimentação de alevinos de tilápia *O. niloticus* com as rações, I, II, III e comercial, foram encontrados com a ração I e II. Embora a ração III tenha sido considerada semelhante a ração comercial.

Os resultados dos testes biológicos com a alimentação de alevinos de tilápia tailandesa com ensilados contendo folhas e pecíolos de *E. crassipes* e carcaças de pargo mostraram que as rações contendo esses ensilados poderão perfeitamente dar suporte ao crescimento de alevinos de peixes e representar uma alternativa para as rações oferecidas comercialmente na aquicultura.

8. CONCLUSÕES

1. Os extratos totais elaborados a partir de folhas e pecíolos de *E. crassipes* não mostraram atividade hemaglutinante quando em contato com eritrócitos, tratados com as enzimas bromelaína e tripsina nas proporções de 0,1 mg /10 ml da suspensão, do sangue humano tipo A, B e O, de galinha e de coelho.

2. A toxicidade para os extratos totais de folhas e pecíolos de *E. crassipes* através de injeção intraperitonal em camundongos não foi considerada positiva;

3. A composição de aminoácidos em porcentagem de aminoácido presente na proteína da folha ou pecíolo de *E. crassipes* possui os aminoácidos essenciais em quantidades maiores do que as requeridas na alimentação de peixes, com exceção da metionina.

4. A folha de *E. crassipes* mostrou uma grande quantidade de proteína total (21,63%) quando comparada com a quantidade encontrada no pecíolo (3,21%). Entretanto, as folhas e os pecíolos apresentaram altos teores de carboidratos totais, 53,43 e 64,37%, respectivamente.

5. Os fermentos apresentaram um odor característico de fermento e uma textura pastosa.

6. Os ensilados I e II mostraram o mesmo grau de acidez e pH no final do processamento, estabilizando, quanto ao pH, após o sexto dia.

7. Os ensilados III e o IV atingiram a estabilização a pH em torno de 4,5, e grau de acidez em torno de 3,5%, após o sexto dia de incubação.

8. O ensilado III mostrou maiores teores de hexadecanóico e octadecenóico; o ensilado IV maiores quantidades dos ácidos hexadecanóico e octadecadienóico e o ensilado III altos teores de hexadecanóico e octadecenóico.

9. Após o quarto dia de incubação os ensilados mantiveram-se livres de coliformes. Durante o período de incubação não foram detectados os microrganismos *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* ou *Vibrio parahaemolyticus*.

10. As porcentagens de proteínas totais obtidas na formulação das rações estão de acordo com as exigências protéicas para a alimentação de alevinos de tilápias do Nilo.

11. A ração I possui maiores teores relativos dos ácidos hexadecanóico, e o octadecenóico; na ração II pode-se encontrar maiores quantidades dos ácidos hexadecanóico e do octadecadienóico; na ração III, os ácidos com maiores porcentagens encontrados foram o hexadecanóico e o octadecenóico; As rações II e III apresentam o ácido linoléico, considerado essencial para os animais.

12. Pelo índice de conversão alimentar dos alevinos revertidos de tilápia do Nilo *O. niloticus* linhagem tailandesa, alimentadas com as rações I, II, III e comercial, pode-se afirmar que o melhor aproveitamento das rações foi obtido com alevinos alimentados com as rações I e II.

13. Os indivíduos alimentados com as rações I e II atingiram o peso de 60 g após 75 dias, enquanto, aqueles alimentados com as rações III e comerciais só atingiram o peso ideal (60 g), para o final da alevinagem, após

90 dias. Portanto, as rações elaboradas com os ensilados III e IV apresentaram maior taxa de aumento de peso.

14. O acompanhamento do crescimento dos alevinos de tilápia *O. niloticus*, quando alimentados com as rações I, II, III e comercial, mostrou melhor resultado com os alevinos alimentados com as rações I e II.

15. De acordo com a análise estatística dos resultados de altura e peso dos alevinos de tilápia *O. niloticus*, alimentados com as rações I, II, III e comercial, houve diferença significativa, ao nível de 5%, entre as rações I e II quando comparadas com a ração comercial. Os testes estatísticos também afirmam que não houve diferença significativa ao nível de 5% entre as rações III e comercial.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; COOKE, R. D.; TWIDDY, D. R., Fermentation parameters involved in the production of lactic acid preserved fish-glucose substrates. *Int. J. Fd. Sci. Technol.*, **22**, 105-114, 1987.

ADOLFO LUTZ, Normas Analíticas, Vol. I: *Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos*. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 371p. 1985.

AFONSO, I. O. B. et al., Métodos para a incubação artificial de ovos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), *Rev. Bras. Zoot.*, Porto Alegre, **22**, (3), 502-505, 1993.

AHMED, J., MAHENDRAKAR, N. S., Effect of different levels of molasses and salt on acid production and volume of fermenting mass during ensiling of tropical freshwater fish viscera., *J. Food Sci. Technol.*, **32**, 115-118, 1995.

AHMED, J., MAHENDRAKAR, N. S., Growth and meat quality of broiler chicks fed with fermented fish viscera silage., *Int. J. Animal Sci.*, **11**, 1-5, 1996a.

AHMED, J. MAHENDRAKAR, N. S., Autolysis and rancidity development in tropical freshwater fish viscera during fermentation, *Bioresource Technology*, **58**, 247-251, 1996b.

AHMED, J.; MAHENDRAKAR, N. S., Acceleration of Fish Viscera Silage by Fermented Starter Culture. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. **35** (2): 171-177. 1997.

AHMED, J.; RAMESH, B. S.; MAHENDRAKAR, N. S., Changes in microbial population during fermentation of tropical freshwater fish viscera, *Journal of Applied Bacteriology*, **80**, 153-156, 1996.

AINOUZ, I. L., SAMPAIO, A. H., BENEVIDES, N. M. B., FREITAS, A. L. P., COSTA, F. H. F., CARVALHO, M. R., PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. *Botanica Marina*, **35** (11): 475-479, 1992.

ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Ração de Qualidade gera Melhor Resultado, Ano 2, número 5, outubro/dezembro, 1997.

ALLEN, A. K., NEUBERGER, A. The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. *Biochem. J.*, **135**: 307-314, 1973.

AMORIM, M. P. R. *Procedimentos de masculinização de larvas de tilápias empregadas na unidade piscicultura de Bebedouro*, Petrolina, PB. Petrolina: 1999.

ANDRADE, M. O., Alimentos e bebidas produzidos por fermentação, *Série Biotecnologia*, **5** (8), 1980.

ANDRADE V., M. F., Obtenção de ensilado de resíduos de sardinha, *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) e seu emprego nas formulações de rações de mínimo custo para aves. *Dissertação de Mestrado*, Rio de Janeiro. UFRJ. 107p. 1982.

ANÔNIMO, Aspectos relevantes da biologia e do cultivo das tilápias, *Panorâmica da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, **5** (27), 8-13, jan./fev. 1995.

AOAC - Association of Official Agricultural CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 12th Ed. Washington D.C. 1094 pp. 1975.

AOAC. *Association of Official Analytical Chemists*, 15^a edição, volume1, 1990.

ARASON, S. *Production of fish silage*. In: *Fisheries Processing. Biotechnological Applications* (ed. A. M. Matin), Chapman and Hall, London, 244-272, 1994.

ARUFUDDIN, R.; KOMPIANG, P., RAA, J. *Report of fish silage: preparation and chemical stability and nutritional value in feeding experiments with chicks*, Research Institute of Fisheries Technology, Jakarta, Indonesia, 1978.

BALOGUN, A. M.; FASAKIN, E. A. OWOLANKE, D. Evaluation of Fish Silage/ Soybean Meal Blends as Protein Feedstuff for *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) Fingerlings. *Journal of Applied Animal Research* **11**(2): 129-136, 1997.

BARSI, B. K., SIAGHAL, R. S., KALKARNI, P. R. Optimization of a process for preparing carboxymethyl cellulose from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), 1997.

BATISTA, I. *Fish silage: preparation and uses*. In: *Nutrition in Marine Aquaculture*, ed. A., Bruno. FAO/UNDP/MEDRAP, Tunis, Tunísia, pp., 227-248, 1987.

BATISTA, I.; MENDES, M. L.; NUNES, M. C. Preparation, characterization and quality control of different kinds of fish silage. NATO PROJECT (*Technology of Fish Feed Production*) Technical Report, INIP, Lisboa, 21pp. 1989.

- BENEVIDES, M. B. B.; SOUZA E SILVA, S. M.; MAGALHÃES, S. R.; MELO, F. R.; FREITAS, A. L. P.; VASCONCELOS, I. M. Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten Brazilian marine algae, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **10** (1): 31-36, 1998.
- BRAGA, R. A. Sobre a planta pirrichio, *Hydrothrix gardneri* Hook em piscicultura. *Cha e Qui.*, S. Paulo, **83** (5): 633-634, 1 fig. 1951.
- BRAGA, R. A. *Plantas do Nordeste*, Especialmente do Ceará, Centro de Divulgação Universitária, No. 2, série 1, 1953.
- BRAGA R. ADHEMAR, NEPOMUCENO, F. HILTON, Controle de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms pelo Bihedonal. *Bol. do DNOCS*, **27** (2/4) abril/dez, 1969
- BROEKAERT, W. F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B., PEUMANS, W. A. Lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. *Biochem. J.*, **221**: 163 -169, 1984.
- BROWSE, J.; MIQUEL, MARTINI. Role of polyunsaturated fatty acids in growth and development of Arabidopsis in: *Plant Lipid Metabolism*, 15-17, editado por Jean-Calude Kader and Paul Masliak, London, 1995.
- CAMMUE, B. P., PEETERS, B., PEUMANS, W. Isolation and partial characterization of an N-acetylgalactosamine-specific lectin from winter-aconite (*Eranthis hyemalis*) root tubers. *Biochem. J.*, **227**: 949 - 955, 1985.
- CANONIZADO, S. The status silage research in the Philippines, In: Fish silage Production and its Use. DISNEY, J. G., JAMES, D., *FAO Fish. Rep.* Roma, **230**, 24-26, 1980.
- CARLINI, C. R., BARCELOS, G. B. S., BAETA-NEVES, A. D. V., GUIMARÃES, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin among proteins of leguminous seeds. *Phytochemistry*. **27**, 25-30, 1988.
- CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*. **19**, 667-676, 1981.
- CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon*, **29** (7), 791-806, 1991.
- CARNEIRO, ANTONIO R. X. Elaboração e uso de ensilado biológico de pescado na alimentação de alevinos de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)., *Dissertação de mestrado*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 1991.

CARNOVALE, E.; MARLETTA, L.; MARCONI, E.; BROSIO, E. Nutritional and hydration properties in cowpea. In: NG, N. Q., MONTI, L. M. (ed.) *Cowpea Genetic Resources*. Thailand: Amarin Printing Group Co. Ltd., cap. 3, p. 11-113, 1990.

CHAMPE, P., HARVEY, R. Bioquímica. Ed: Artes Médicas Sul Ltda: Porto Alegre. 2ª ed. 446p. 1997.

CHETAL, S.; WHGLE, D. S.; NAINAWATEE, H. S. Alteration in glycolipids of wheat and barley leaf under water stress. *Phytochemistry*, **21**, 51-53, 1982.

CHRISPEELS, M. J. RAIKHEL, N. V., Lectins genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell.*, **3**, 1-9, 1991.

COCCONCELLI, P. S.; TRIBAN, E.; BASSO, M. AND BOTTAZZI, V. Use of DNA probes in the study of silage colonization by *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains. *Journal of Applied Bacteriology*, **71**, 296-301, 1991.

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

DEMBITISKY, V. M.; ROZENTSVET, O. A.; SHUKOVA, V. S.; VASILENKO, R. F., KASHIN, A. G. Lipid composition of freshwater macrophytes from the Volga river estuary, *Phytochemistry* **31**: 3259-3261, 1992.

DISNEY, J. G.; HOFFMAN, A. A dried fish silage product. In Proceedings Torry Research Station Sympo. *On Fish Silage*, Aberdeen, UK, 1976.

D'MELLO, J. P. F., DUFFUS, C. M., DUFFUS, J. H. Toxic substances in crop plants. Ed. *The Royal Society of Chemistry*, **4**, p. 104, 1991.

DUFFUS, C. M., DUFFUS, J. M. Introduction and overview. In: - *Toxic Substances in Crop Plants*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p. 1-20, 1991.

DUFFNER, F.; FITZSIMONS, G. B.; O'KIELY, P. AND O'CONNELL, M. Dominance of *Lactobacillus plantarum* strains in grass silage as demonstrated by a novel competition assay., *Journal of Applied Bacteriology*, **76**, 583-591, 1994.

EDWARDS, P.; POLPRASERT, C.; WEE, K. L. Use of ensiled septage-raised tilapia as feed ingredient for carnivorous fish production. In Resource Recovery and Health Aspects of Sanitation. AIT Research Report No. 205, Environmental Sanitation Information Center, *Asian Institute of Technology* (AIT), Bangkok, Thailand, 164-183, 1987.

EGGUM, O. B.; STROM, T. Nutritional value of fish viscera silage, *J. Sci. Fd. Agric.*, **32**, 115-120, 1981.

ENIKUOMEHIN, O. A.; IKOTUN, T.; EKPO, E. J. A. Evaluation of ash from some tropical plants of Nigeria for the control of *Sclerotium rolfsii* Sacc, on wheat (*Triticum aestivum* L.), *Mycopathologia*, **142**, 81-87, 1998.

ESPE, M.; RAA, J., NJAA, L. R. Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats, *J. Sci. Food Agric.*, **49**, 259-70, 1989.

FAGBENRO, O. A.; BELLO-OLUSOJI O. A. Preparation, Nutrition Composition and Digestibility of Fermented Shirimp Head Silage. *Food Chemistry*, **60** (4): 489, 1997.

FAGBENRO O. A.; FASAKIN, E. A. Citric-acid-ensiled poultry viscera as protein supplement for catfish (*Clarias gariepinus*), *Bioresource Technology*, **58**, 13-16, 1996.

FAGBENRO, O. A.; JAUNCEY, K. Chemical and nutritional quality of fermented fish silage containing potato extracts, formalin or ginger extracts, *Food Chemistry*, **50**, 383-388, 1994.

FAGBENRO, O. A.; JAUNCEY, K.; KRUEGER, R. Nutritive Value of Dried Lactic Acid Fermented Fish Silage and Soybean Meal in Dry Diets for Juvenile Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Journal of Applied Ichthyology*, **13** (1): 27-30. 1997.

FAID, M.; ZARANI, H.; A. ;ELMARRAKCHI, A.; ACHKARI-BEGDOURI, A. A biotechnological process for the valorization of fish waste. *Bioresource Technology*, **49** 237-241, 1994.

FAID, M.; ZOUITEN, A. ;ELMARRAKCHI, A.; ACHKARI-BEGDOURI, A. Biotransformation of Fish Waste into a Stable Feed Ingredient. *Food Chemistry*, **60** (1): 13-18, 1997.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, 112p., 1998.

FAO/FIDI. *Estatística da aquicultura mundial no ano de 1992*. 1993.

FENICAL, W. *Natural products chemistry in the marine environment*. *Science* **215**, (4535), 923-928, 1982.

FERRARI-ILIOU, R.; PHAM THI, A. T.; VIEIRA DA SILVA, J. Effect of water stress on the lipid and fatty acid composition of cotton (*Gossypium hirsutum*) chloroplast plant, *Physiology*, **62**, 219-224, 1984.

FOX, C. J., BLOW, P., BROWN, J. H.; WATSON, I. 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*, **122**, 209-226, 1994.

FREITAS, J. V. F.; GURGEL, J. J. S. Estudos experimentais sobre a conservação da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L. 1766) Trewavas, armazenada no Gelo. *B. Téc. DENOCS*, Fortaleza, **42** (2), 153-178, 1984.

GILDBERG, A.; RAA, J. Properties of propionic acid/formic acid preserved silage of cod viscera, *J. Sci. Food Agric.*, **28** (3), 647-653, 1977.

GILDBERG, A. Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera, *Bioresource Technology*, **39**: 271-276, 1992.

GOPAL, B. Water hyacinth. *Elsevier Science Publishers*, Amsterdam, 1987.

GUILHERME, L. C. Efeitos da metoprololona (17 Beta-Hidroxi-1 alfa-Metil-5-Alfa-Androstan-3-Ona) na inversão do sexo em *Oreochromis niloticus*. Lavras, Minas Gerais, *Dissertação (Mestrado em Zootecnia. Escola Superior de Agricultura de Lavras.*, 49p. 1990.

GUIRCA, R.; LEVIN, R. E. Optimisation of lactic acid fermentation of hydrolysed cod gurry with molasses. *Journal of Food Biochemistry* **16**, 83-87, 1992.

GURGEL, J. J. S. Potencialidade do cultivo de tilápia no Brasil. In *Congresso nordestino de produção animal*, Fortaleza, 1998. Anais... Fortaleza: *Sociedade Nordestina de Produção Animal*, 345-352, 1998.

GURGEL, M. P. O. S.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F.; MARTIN, ANTONIO M, Enzymatic hydrolysis of the shark raw muscle *Gynglimnostoma cirroatum*, *Arquivos de Ciências do Mar*, aceito em janeiro de 2002.

HAMERSTRAND, G. E., BLACK L. T.; GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chem.*, **58**, 42-45, 1981.

HARTLEY, M. R., CHADDOCK, J. A. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. *Trends in Plant Science*, **1**, (8), 254-260, 1996.

HAY, M. E., FENICAL, W. Marine plant-herbivore interaction. The ecology of chemical defense. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **19**, 11-45, 1988.

HAY, M. E., FENICAL, W., GUSTAFSON, K. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology*, **68**, (6), 1581-1591, 1987.

HENDERSON, R. J. AND TOCHER, D. S. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish, *Prog. Lipid. Res.*, **26**, 281-347, 1987.

- HERNANDEZ, A. R. *Cultivo de Colossoma*, Editora Guadalupe, 1989.
- HILLER, A.; PLAZIN, J.; Van-SLYKE, B. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. *J. Biol. Chem.*, **176** (3): 1401-1420, 1948.
- HILSDORF, A. W. Genética e cultivo de tilápias vermelhas. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, **22** (1), 73-84, jan. – jun., 1995.
- HIOTT, A. E., PHELPS, R. P. Effects of initial age and size on Sex reversal of *Oreochromis niloticus* using methyltestosterona. *Aquaculture*, Amsterdam, **112**, (1), 301-308, set. 1993.
- INAN-IPEA-IBGE, *Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição*, 1989.
- IVO, C. T. C.; FONTELES-FILHO, A., A. *Estatística Pesqueira: Aplicação em Engenharia de Pesca*. Tom Gráfica Editora, 193pp., Fortaleza-Ceará, 1997.
- JACOB, P. G. Fish silage, a valuable product from fish waste and trash fish. *Seafood J.*, **6**, 39-41, 1974.
- KACHOURY, MONTHER, M'SALEEN, MONGI; ZARROUK, MOKHTAR; CHERIF, ABDELKADER, Comparative study of oil composition in four olive varieties. in: *Plant Lipid Metabolism*, editado por Jean-Calude Kader and Paul Masliak, London, 1995.
- KIVAIISI, A. K.; MTILA, M. Production of biogas from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) (Mart) (Solms) in a two-stage bioreactor, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **14**, 125-131, 1998.
- KOVACS, G. *Métodos de controle da população de tilápias*. Fortaleza – Ce. Ministério da Agricultura, DNOCS, *Diretoria de Pesca e Piscicultura*. DNOCS-AGROBER, 1990.
- KOVACS, G.; NOBRE, M.I.S.; MESQUITA, M. S. C. Estudo comparativo de dois tipos de hormônios masculinos usados na reversão do sexo da tilápiã do Nilo, *Oreochromis niloticus* L., 1766, *B. TÊC. DNOCS*, Fortaleza, **47-52**, (1-2), 227-240, 1994.
- LANARA – Laboratório Nacional de Referência Animal, Ministério da Agricultura. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. Métodos microbiológicos. Brasília, 1981.
- LESSI, E.; XIMENES CARNEIRO, A. R.; 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, 8p. 1989.

LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, 600 pp., Academic Press, New York, 1986.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. *The Biochemistry of Plants*, **6**: 371 - 447, 1998.

LUCK, K. E., ZISKA, P., KOPPITZ, H. Affinity sorbent of galactose-specific lectins consisting of deproteinized plant cell wall ghost. *Plant Science*, **82**, 29-35, 1992.

LUPÍN, H. M. Seminário sobre manipuleo, 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 en America Latina. In: *Comision de pesca continental para America Latina (COPESCAL)*, 3. Mexico, D. F., 12p. 1983.

MACKIE, I. M. Proteolytic enzymes in recovery of proteins from fish waste, *Process Biochemistry*, **9**, (10), 12pp, 1978.

MACKIE, I. M., Fish protein hidrolysates. *Process Biochemistry*, **17** (1), 2-28, jan/feb., 1982.

MAHAN, L. KATHLEEN; ESCOTT-STUMP, SILVIA-KRAUSE, *Alimentos, Nutrição & Dietoterapia*, 9a. edição, São Paulo; ROCA, 1998.

MAHENDRAKAR, N. S., JHABADE, V. S., JAGANNATHA RAO, R., LATHA, R.; DANI, N. P. Influence of feeding fish and pountry viscera silage to broiler chicks on their performance and meat quality. *Int. J. Animal Sci.*, **6**, 19-26, 1991.

MAIA, EVERARDO L. Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em ácidos graxos e aminoácidos de peixes de água doce. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas. 1992.

MARENGONI, N. G. *Reversão sexual "cultivo de tilapia – Módulo VI. In. Curso de formação em piscicultura*, 2., Presidente Prudente, Apostila... Presidente Prudente, 21p., 1999.

MARQUEZ, U. M. L.; LAJOLO, F. M. Digestibility of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) albumins and globulin G I: contribution of endogenous nitrogen and sulfur. In: _____. *Advances in Bean Research: Chemistry, Nutrition and Technology*. São Paulo: University of São Paulo, 3-21, 1988.

METCALFE, I. D.; SCHEMITZ, A. A.; PELKA J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chemistry*, **38**, 514-515, 1966.

MEYERS, S. P.; BENJAMIN, G. Feeding values of grustacean wastes can be improved through proper ensilage treatment, *Feedstuffs*, **59**, 12-13, 1987.

MITRA, T.; BISWAS, P.; MANDAL, L.; BANERJEE, G. C. Efect of feeding water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in different forms on the palatability in buffalo calves, *Indian Vet. J.*, **74**, 935-937, 1997a.

MITRA, T., BISWAS, P.; MANDAL, L.; BANERJEE, G. C. Evaluation of nutritive value of wilted and fresh forms of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Murrah buffalo calves., *Indian Journal of Animal Science*, **67** (10): 928-929, October, 1997b.

MOREIRA, R. A. Tese de Titular, Universidade Federal do Ceará, 600 pp., 1998.

MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. *Biologia Plantarum*, **26**, n. 5, p. 336-342, 1983.

MWADAMWAR, D.; PATEL, A.; PATEL, V. Effect of temperature and retention time on methane recovery from water hyacinth cowdung, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, 340-342, 1990.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrients requirements of warmwater fishes and shellfishes.*, Washington, USA, 102p. 1983.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrients requerements of fish.* Washington, USA, 114p. 1993.

NICHOLSON, J. W. G.; McQUEEN, R. E.; ALLEN, J. G. AND BUSH, R. S. Composition, digestibility and rumen degradability of crab meal, *Canadian Journal of Animal Science*, 89-94, 1995.

NOGUEIRA DA SILVA, A. L. Hibridação de tilapia. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, **7**, (39), p. 16, jan.-Fev., 1997.

NORTON, G. Proteinase inhibitors. In: D'MELO, J. P. F., DUFFUS, C. M. (ed.) Toxic Substances in Crop Plants. Edinburg: *The Scottish Agricultural College*, **4**, 69-106, 1991.

OETTERER, M. Produção de silagem a partir da biomassa residual de pescado, *Alim. Nutri.*, São Paulo, **5**: 119-134, 1994.

OETTERER DE ANDRADE, M. Produção de silage a partir da biomassa de pescado: levantamento bibliográfico sobre os diferentes tipos de silagem que podem ser obtidos com pescado; silagem química, enzimática e microbiana. Piracicaba, Depto. Ciênc. Tecnol. Agroin. Da ESALQ/USP, 25pp., 1995.

OLSNES, S., REFSNES, K., PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins *abrin and ricin*. *Nature*, **249**, 627-631, 1974.

OWENS, J. D.; MENDONZA, L. S. Enzimically hydrolysed and *bacterially* fermented fishery products, *J. Food Technology*, **20**, 273-293, 1985.

PARRISH, C. C.; McLEOD, C. A.; ACKMAN, R. G. Sensory evaluation of Atlantic salmon fed three types of herring-based diet, *J. Sci. Food Agric.*, **68**, 325-329, 1995.

PASCHOLATI, S. F., LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) *Manual de Fitopatologia*, **1**, 3ed., São Paulo, Ed. Agr. CERES, 1995.

PAULA, FERNANDO, M. Role des especes moleculaires des lipides membranaires dans la resistance a la secheresse chez le niebe (*Vigna unguiculata* L.). *Universite Paris VII - These*, 1992)

PEARCE, F. All-out war on the alien invader, *New Scientist*, **2135**, 34-38, 1998.

PEREZ-LORENZO, S., LEVY-BENSHIMOL, A., GOMEZ-ACEVEDO, S. Presencia de lectinas, taninos e inibidores de proteasas en algas marinas de las costas venezolanas. *Acta Científica Venezolana*, **49**, 141-151, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, W. J. N. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology*, **109**: 347 - 352, 1995.

PEUMANS, W. J., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B.; BROEKAERT, W. F. Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizomes. *Planta*, **164**: 75 - 82, 1985.

PEZZATO, A. C. *Formulação de Rações*, Ed. Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 1995.

PEZZATO, L. E. Efeito de níveis de proteína sobre o crescimento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetida a reversão sexual. Piracicaba-SP. 90p. *Dissertação (Mestrado em Agronomia, Universidade de São Paulo*, 1984.

PEZZATO, L. E. O estabelecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes cultivados. In: *Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes*, Piracicaba-SP, Julho, 45-62, 1997.

POPMA, T., GREEN, B. W. Sex reversal of tilapia in earthen ponds: *Aquaculture Production Manual*. Auburn university, Alabama. *Research and Development*. **35**, 15pp., 1990.

POPMA, T., LOVSHIN, L. Aspectos relevantes da biologia e do cultivo das tilápias. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, **5**, (27), 8-13, jan – fev., 1995.

RAA, J. AND GILDBERG, A. Fish silage. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutritional*, **16**, 383-419, 1982.

RAA, J.; GILDBERG, A.; STROM, T. *Silage production theory and practice in upgrading waste for feeds and food*, eds. D. A. Ledward, A. J. Taylor & R. a Lawrie, Nottingham, 1983.

RAMOS, M. V.; MONTEIRO, A. C. O.; MOREIRA, R. A. CARVALHO, A. F. F. U. Amino acid composition of some brasilian seaweed species. *Journal of Food Biochemistry*, **24**, 33-39, 2000.

RIBEAU-GAYON, J., PEYNAUD. E. *Traite d'ampelologie, sciences et techniques de la vigne* / J. Ribereau-Gayon, E. Peynaud. Paris: Dunod., 719 pp., 1971.

RIBEIRO, M. A. G. Reversão sexual de tilápias. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, **6**, (37), 14-18, set.-out., 1996.

SANTOS, A. L. L.; AZEVEDO, J. L. ; CHOPIN, M. C. *Streptococcus lácticos e seus bacteriófagos*, *Bol. Ital.*, Campinas, São Paulo, **23** (1), 17-59, 1986.

SCHIMITTOU, H. R. *Produção de Peixes em alta Densidade em Tanques-rede de Pequeno Volume*, ASA, Associação Americana de Soja, República Popular da China, 1993.

SEKKAT, S. R. Données statistiques et aconomiques sont disposé à l'Institut Scientifique des pêches amintenus pour L'étude du secteur da la pêche au Maroc. *Rapport de la FAO* (468), 8-123, 1991.

SGARBIERI, V. C. Fontes de proteínas na alimentação. In: SGARBIERI, V. C. (ED.). *Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades, Degradação e Modificações*. São Paulo: Livraria Varela Ltda., **2**, 139-257, 1996,.

SHARON, N., LIS, H. "Lectins". New York: Chapman and Hall, 1989.

SILVA, A. N., SOUZA, R. A. *Glossário de aqüicultura*, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Imprensa Universitária, 97pp., 1998.

SILVA, J. W. B. A piscicultura no Estado do Ceará. In: *Congresso da Sociedade Nordestina de Produção Animal*, Anais. Fortaleza: SPNA, **1**, 355-367, 1998.

SILVA J. W. B. Análise prospectiva da piscicultura no âmbito do projeto de transposição das águas do rio São Francisco., Fortaleza, VBA, 44p. 1999.

SILVA, J. W. B. Contribuição das tilápias (Pisces, Cichlidae) para o desenvolvimento da piscicultura no Nordeste brasileiro, especialmente do estado do Ceará., *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca, 2001.

SILVA, P. R. R. Uso de hormônio 17α - metil testosterona para induzir o aumento da altura em alevinos machos revertidos da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus, 1976). *Tese de Mestrado*, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce-Brasil, 2000.

SILVA, S. L. A. Controle biológico de *Anacharis densa* (Planch) Vict., nos lagos da Universidade Rural, do Rio de Janeiro. *Agronomia*, Rio de Janeiro, **18** (5): 117-127, 6 figs.1960.

SOLLY, R. K.; SINGH, D.; SHARAN, V. Water hyacinth as feed supplement for small animals., In: *Proceeding of the International Conference on Water Hyacinth* (G. Thyagarajan, ed.), United Nations Environment Programme, Nairobi, 398-407, 1984.

SSEKABEMBE, C. K.; SABAITI, E. N. The potential for joint production of napier grass and food crops. *African Crop Science Conference Proceedings*, **3**, 825-834, 1997.

STEFANOV, K.; DIMITROV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S. ; KIRISHEVA, L.; POPOV, S. Lipid and sterol composition of the freshwater alga *Spirogyra crassa* (L.) Kutz (Chlorophyta), *Arch. Hydrobiol.*, **135**, (4), 523-527, 1996.

STONE, F. E.; HARDY, R. W. Nutritional value of acid stabilish silage and liquefied fish protein., *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 797-802, 1986.

SUMMER, J. Performance of pigs fed on diets containing fish silage. Evaluation in commercial situation. *Proceedings of IPFC*, 18th edn, Manila, The Philippines, 1978.

TALBOT, C. F.; ETZLER, M. E. Isolation and characterization of a protein from leaves and stem of *Dolichos biflorus* that cross reacts with antibodies to the seed lectin. *Biochemistry* **17** (8): 1474 - 1478, 1978.

TOCHER, D. R.; MOURENT, G.; SARGENT, J. R. The Use of Silages Prepared from Fish Neural Tissues as Enriches for rotifers (*Brachionus plicatilis*) and Artemia in the Nutrition of Larval Marine Fish., *Aquaculture*, **148** (2-3): 213-231, 1997.

TRIEBOLD, H. O. *Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products*. D. Van Nostrand Co., New York, 331pp., 1946.

- VAN DAMME, E. J. M., ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Lett.*, **215**: 140 - 144, 1987.
- VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. *Handbook of Plant Lectin: Properties and Biochemical Applications*. John Wiley; Son, Chichester, UK, 452pp, 1998.
- VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A. B., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F. U., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two brazilian soybean (*Glicine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **12**, 55-62, 2001.
- VASCONCELOS, I. M., TRENTIN, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans *Glycine max*. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, (2), 1994.
- VIEIRA, G. H. F., MARTIN, A. M., SAKER-SAMPAIO, S.; SOBREIRA-ROCHA, C. A.; GONÇALVES, R. C. F. Production of protein hydrolisetes from lobster (*Panulirus spp.*), In, George Charalambus, *Food Flavors: Generation Analysis and Process Influence*, 37B, ed. Elsevier, 1405-1415, 1995.
- WEE, K. L.; KERDCHUEN, N.; EDWARDS, P. Use of waste grown tilapia silage as feed for *Clarias batrachus* L., *Aquaculture Tropcs*, **1**, 127-137, 1986.
- WHITMORE, F. W. A hemagglutinating substance in chitin. *Biotechniques*, **12**, (2), 202pp., 1992.
- WIGNALL, J.; TATTERSON, I. N. Fish silage., *Process. Biochem.*, **11**, 17-22, 1977.
- WILSON, R. P. Fish feed formulating and processing., In: Simpósio Internacional sobre Nutrição de Peixes e Crustáceos. Campos do Jordão, SP, Novembro, 53-68, 1995.
- WINDSOR, M.; BARLOW, S. *Introduccion a los subproductos de Pesqueria*. Espanã, Acríbia. 204p. 1984
- WOOMER, P. L. Managing water hyacinth invasion through integrated control and utilization: perspectives for Lake Victoria. *African Journal of Crop Science*, **5**, 309-324, 1997.
- WOOMER, P. L.; MUZIRA, ROBERT; BWAMIKI, DAVID; MUTETIKKA, DAVID; AMONDING, ALICE; BECUNDA, MATEETE A. Biological Management of water hyacinth waste in Uganda, *Biological Agriculture and Horticulture*, **17**, 181-196, 2000.

XAVIER-FILHO, J. *The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, **4**, 1-6, 1992.

YOOU, H. D., LEE, D. S., SUH, S. B. Studies on the Utilization of Wastes from Fish Processing: II. Changes of Chemical Properties of Skipjack tuna Viscera Silage During Storage by the Processing Method. *Journal of the Korean Fisheries Society*, **30** (1), 8-15, 1997a.

YOOU, H. D., LEE, D. S., CHENONG, I. L., SUH, S. B. Studies on the Utilization of Wastes from Fish Processing: I. Characteristics of Lactic Acid Bacteria for Preparing Skipjack tuna Viscera Silage. *Journal of the Korean Fisheries Society*, **30** (1), 1-7, 1997b.

ZIMMERMANN, S. Incubação artificial. Técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, **9**, 54, 15-21, jul-ago. 1999.

ZIMMERMANN, S. Tilápia, *Panorama da Aquicultura*, **10** (60), Julho/agosto, 15, 2000.