UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

BIOMASSA BACTERIANA COMO ADITIVO DE RAÇÃO DE AVES E PEIXES

Ane Pamela Capucci Torres

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

BIOMASSA BACTERIANA COMO ADITIVO DE RAÇÃO DE AVES E PEIXES

Ane Pamela Capucci Torres

Orientadora: Profa. Adjunto Elisa Helena Giglio Ponsano

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Curso de Medicina Veterinária, *Campus* de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2010

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T693b

Torres, Ane Pamela Capucci.
Biomassa bacteriana como aditivo de ração de aves e peixes / Ane Pamela Capucci Torres. - Araçatuba : [s.n.], 2010
53 f. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientadora: Profa. Elisa Helena Giglio Ponsano

1. *Rubrivivax gelatinosus* 2. Carotenóides 3. Pigmentos biológicos 4. Efluentes industriais

CDD 636.0896

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Biomassa bacteriana como aditivo de ração de aves e peixes

AUTOR: ANE PAMELA CAPUCCI TORRES

ORIENTADOR: Dr.ª ELISA HELENA GIGLIO PONSANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES

Dr. OTTO MACK JUNQUEIRA

Dr.ª ELISA HELENA GIGLIO PONSANO

DATA DA REALIZAÇÃO: 05 de novembro de 2010.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª ELISA HELENA GIGLIO PONSANO
- Orientadora -

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Seção de Pós-Graduação
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-3224 E-mail: posgrad@foa.unesp.br

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANE PAMELA CAPUCCI TORRES - nascida em 19 de agosto de 1985, em Andradina, SP. É Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina em dezembro de 2007. Realizou estágio curricular na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Pecuária Sudeste em 2007. Foi estagiária da Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de São Paulo – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, SIF 385 Friboi, Unidade de Andradina-SP em 2007. Foi estagiária da Coordenação de Estágios do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina de 2005 a 2007. Foi monitora das disciplinas de Anatomia Descritiva I e II em 2004 e 2005 na Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina. Foi estagiária da Universidade Estadual Paulista – Campus de Ilha Solteira, nas áreas de Zoologia, Parasitologia e Nutrição de Ruminantes em 2004.

DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir mais esta vitória em minha vida.

Aos meus pais, irmãos, esposo, cunhados e avós, por proporcionarem a realização deste sonho, incentivando e apoiando em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos, pelas alegrias nas horas de desanimo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos, esposo, cunhados e avós, pelo incentivo e apoio durante esta jornada muito importante para minha vida.

À Profa. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Franke Pinto, pelas instruções quando aluna especial do curso de mestrado da Instituição, por acreditar em meus sonhos, confiar em mim e me apresentar a Doutora Elisa.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Otto Mack Junqueira e Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles por ajudarem a enriquecer os dados descritos neste trabalho.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciência Animal da UNESP, Câmpus de Araçatuba, pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

Aos funcionários da Pós-Graduação e do Curso de Medicina Veterinária, pelo pronto atendimento em todas as ocasiões e companheirismo.

Aos alunos de Graduação, Iniciação Científica e Pós-Graduação, pela amizade e pelos momentos compartilhados.

À Indústria Tilápia do Brasil de Buritama/SP, pela doação do efluente.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara – Unesp, pela realização do aminograma.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do trabalho.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

BIOMASSA BACTERIANA COMO ADITIVO DE RAÇÃO DE AVES E PEIXES

RESUMO – *Rubrivivax gelatinosus* é uma bactéria fototrófica natural de ambientes aquáticos que apresenta a capacidade de crescer em substratos contendo diversos compostos orgânicos. Neste trabalho, a biomassa da bactéria, produzida em águas residuárias provenientes de abate e processamento de pescado, foi caracterizada em relação a cor, composição centesimal, composição microbiológica e conteúdo de pigmentos carotenóides e aminoácidos, visando avaliar seu potencial como ingrediente para ração animal. Os resultados encontrados apontaram valores médios de 57% de proteína bruta, 23% de extrativo não nitrogenado e contaminantes, 11% de extrato etéreo, 5% de umidade e 4% de matéria mineral. Vários aminoácidos considerados essenciais para diversas espécies animais foram detectados no produto, tais como metionina (0,66g/100g), lisina (4,52g/100g), fenilalanina (3,43g/100g) e valina (4,39g/100g). Os resultados das análises microbiológicas indicaram contagens médias de 5,3 x 10^6 UFC/g para bactérias mesófilas aeróbias e facultativas viáveis, 20,27 NMP/g para coliformes a 35°C, <1,0 NMP/g para coliformes a 45°C e 1,2 x 10^3 UFC/g para bolores e leveduras. Não foram encontrados *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp. e estafilococos coagulase positivo. O resultado da análise objetiva da cor da biomassa indicou valores médios de 25,48 para tonalidade, 14,22 para saturação da cor e 22,42 para luminosidade. A concentração média de carotenóides foi de 3,03 mg/g de

biomassa. A determinação da composição e das características sensoriais da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* indicaram baixo nível de contaminação microbiana e alto potencial nutricional e pigmentante, apontando positivamente para sua utilização como ingrediente de rações na criação de animais.

Palavras-Chave: *Rubrivivax gelatinosus,* carotenóides, pigmentos biológicos, efluentes industriais

BACTERIAL BIOMASS AS FEED ADDITIVE FOR POULTRY AND FISH

SUMMARY - *Rubrivivax gelatinosus* is a photoautotrophic bacterium that inhabits aquatic environment in which it uses different organic substrates for growth. In this work, the biomass of the bacterium, grown in effluent from fish slaughter and processing industry was characterized for color, proximate composition, microbiological composition, carotenoids and amino acids contents, with the aim of evaluating its potential as a feed ingredient. Mean results showed 57% crude protein, 23% non nitrogen extract and contaminants, 11% ether extract, 5% moisture and 4% ashes. Many amino acids considered essential for different animal species were present in the product, like metionine (0.66g/100g), lysine (4.52g/100g), phenylalanine (3.43g/100g) and valine (4.39g/100g). Microbial analysis showed mean counts of 5.3 x 10^6 UFC/g for mesophilic bacteria, 20.27 NMP/g for coliforms at 35°C, <1.0 NMP/g for coliforms at 45°C and 1.2 x 10^3 UFC/g for yeasts and moulds. *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp. and positive coagulase staphylococci were not detected in the product. Results from objective color evaluation showed means at 25.48 for hue, 14.22 for chroma and 22.42 for lightness. Mean carotenoids concentration detected was 3.03 mg/g biomass. The determination of composition and sensorial characteristics of *Rubrivivax gelatinosus* biomass indicated low contamination level and high nutritional and pigmenting potential, pointing out for a positive use of the product as an ingredient for animal feeds.

Keywords: *Rubrivivax gelatinosus*, carotenoids, biological pigments, industrial effluents

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS 13

1 Carotenóides.....15

2 Produção de carotenóides por *Rubrivivax gelatinosus* 19

3 Pigmentação de produtos de origem animal.....21

4 Produtos obtidos por biotecnologia após tratamento de efluentes industriais.....24

5 Objetivos.....26

Referências.....27

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO 33

Resumo.....33

Abstract.....33

Introdução.....34

Material e métodos 35

Resultados e discussão.....38

Conclusões 43

Referências bibliográficas.....43

Anexo A 48

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Análise microbiológica da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* 38

Tabela 2 – Composição centesimal da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente industrial de pescado 39

Tabela 3 – Composição em aminoácidos da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente de abatedouro de pescado, do farelo de soja e da farinha de peixe 41

Tabela 4 – Parâmetros de medida da cor (*L*, luminosidade; *C*, intensidade da cor; *h*, tom) 42

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

O consumidor de alimentos de origem animal tem preferência por produtos de coloração mais intensa, pois associa essa característica a qualidade e frescor dos produtos (PONSANO et al., 2002b). Para garantir uma coloração acentuada em produtos de avicultura e piscicultura, pigmentos carotenóides naturais ou sintéticos ricos em xantofilas são adicionados à alimentação dos animais (BAKER; GÜNTHER, 2004; BREITHAUPT, 2007; HUDON, 1994; NUNES, 1998; TEIXEIRA, 1997).

O atendimento aos requerimentos nutricionais dos animais viabiliza um adequado desempenho produtivo, fator essencial para o sucesso da criação. As exigências nutricionais para aves variam conforme a raça, linhagem, sexo, consumo de ração, nível energético da ração, disponibilidade dos nutrientes, temperatura ambiente, umidade do ar e estado sanitário, entre outros fatores (ROSTAGNO et al., 2005). Para peixes, elas variam conforme a espécie, a fase de desenvolvimento e o tipo de ambiente (água quente ou fria, doce ou salgada) (CYRINO et al., 2004).

Segundo Monteiro et al. (2010), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, biomassa é toda matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana, incluindo os materiais procedentes de suas transformações naturais ou artificiais.

Para que a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* possa ser utilizada como ingrediente de ração animal, é necessário conhecer suas propriedades sanitárias, nutricionais e pigmentantes.

1 CAROTENÓIDES

O termo carotenóides se refere a um grupo de pigmentos coloridos, variando de amarelo alaranjado a vermelho, amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em plantas, animais, fungos, bactérias, algas e protozoários (BHOSALE, 2004; FRANCHINI; PADOA, 1996; NUNES, 1998; OGAWA; MAIA, 1999). Podem ser divididos em duas classes principais: carotenos, que são hidrocarbonetos poliinsaturados e xantofilas, que são os derivados oxigenados, ocorrendo como carotenos carboxilados e hidroxilados, com seus respectivos ésteres, aldeídos, cetonas e epoxis (OGAWA; MAIA, 1999; PONSANO, 2000; STOSKOPF, 1993).

A cor dos carotenóides é o resultado da presença de um sistema de várias duplas ligações conjugadas na molécula, como ocorre com β-caroteno, astaxantina, tunaxantina, luteína, zeaxantina, entre outros (OGAWA; MAIA, 1999). A maioria dos carotenóides é amarela ou vermelha; no entanto, quando ligados a algumas proteínas, podem formar uma variedade de azuis e verdes. Quando as carotenoproteínas são aquecidas, as ligações são rompidas, liberando os carotenóides. Isto explica porque os caranguejos azuis ficam vermelhos quando cozidos (STOSKOPF, 1993).

A alguns carotenóides são atribuídas propriedades pró-vitamínicas, como é o caso do β-caroteno (FONTANA et al., 2000). As xantofilas, no entanto, não são transformadas em vitamina A, porém, apresentam a

capacidade de serem absorvidas e depositadas no tecido adiposo das aves (NUNES, 1998).

Os oxicarotenóides promovem a pigmentação da pele e carne de peixes e aves, e plumagem e ovos de aves. Aproximadamente 90% da astaxantina da carne dos peixes está na forma livre, enquanto a forma éster predomina na pele (NRC, 1993), onde intensifica a coloração, promovendo um aspecto mais saudável e, assim, atraindo outros animais (TORRISSEN; CHRISTIANSEN, 1995).

A deposição de xantofilas em aves de postura ocorre primeiro no tecido subcutâneo, depois no bico e, por último, nos tarsos. No início da postura, começa a transferência dos pigmentos para o ovário e, destes, para a gema (NUNES, 1998). No pescado, os carotenóides originários da dieta são depositados diretamente nos órgãos ou convertidos em carotenóides específicos, de acordo com seus requerimentos metabólicos (OGAWA; MAIA, 1999).

As xantofilas são abundantes na alimentação humana; provenientes do milho *(Zea mays)*, da manga (*Mango indica*), do mamão (*Carica papaya*) e da gema de ovo (FONTANA et al., 2000), por exemplo. Luteína, zeaxantina e criptoxantina são as principais xantofilas presentes no plasma humano (BHOSALE; BERNSTEIN, 2005).

Há evidências de que, em humanos, os oxicarotenóides provenientes da alimentação possam atuar na prevenção do envelhecimento, na diminuição do risco de aparecimento de doenças cancerígenas e cardiovasculares, na

prevenção da degeneração macular e da formação de catarata (BAKER; GÜNTHER, 2004; BHOSALE, 2004; BHOSALE; BERNSTEIN, 2005; WILLIAMS, 1992).

Na produção biotecnológica comercial de pigmentos destacam-se a microalga de água doce *Haematococcus* sp e as leveduras *Phaffia rhodozyma* e *Xanthophyllomyces dendrohous*, produzindo astaxantina, o fungo *Blakeslea trispora* e as microalgas marinhas, produzindo β-caroteno, e *Flavobacterium multivorum* produzindo zeaxantina (AUSICH, 1997; BHOSALE; BERNSTEIN, 2005; BOROWITZKA; BOROWITZKA et al., 1989; FEOFILOVA, 1994; JONHSON; SCHROEDER, 1995). Ponsano et al. (2002b; 2003a; 2003b; 2004a) produziram biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* contendo pigmentos carotenóides da série espiriloxantina alternativa utilizando como substrato o efluente de abatedouro avícola e utilizaram-na experimentalmente como aditivo pigmentante em ração de frangos de corte e galinhas poedeiras.

Os processos de produção de oxicarotenóides por síntese química normalmente são complexos e podem levar à formação de misturas de estereoisômeros não tão ativos quanto às xantofilas naturais e gerar efeitos colaterais indesejáveis. Já por síntese microbiana, somente são produzidos os estereoisômeros naturais, o que garante segurança na composição do produto final (AUSICH, 1997). Estudos realizados por Ponsano et al. (2002a.; 2003a; 2008) e Paulino (2006) mostraram a adaptabilidade da bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* em efluentes de indústria de abate e processamento de pescado, onde a bactéria obteve crescimento satisfatório, produzindo biomassa

rica em carotenóides, utilizando níveis reduzidos de inóculo e condições de cultivo facilmente alcançáveis.

2 PRODUÇÃO DE CAROTENÓIDES POR *Rubrivivax gelatinosus*

A bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus*, anteriormente denominada *Rhodocyclus gelatinosus*, pertence ao grupo das Bactérias Púrpuras Não Sulfurosas (BPNS), é natural de ambientes aquáticos e efluentes industriais e, sob condições de cultivo adequadas, é capaz de crescer em águas residuárias da indústria avícola e de pescado, reduzindo a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e produzindo massa celular (AZAD et al., 2001, 2003; LIMA; PONSANO, 2008; PONSANO et al., 2003a; PRASERTSAN et al., 1997).

Rubrivivax gelatinosus produz bacterioclorofila *a* e carotenóides da série espiriloxantina alternativa (esferoidene, hidroesferoidene e espiriloxantina), responsáveis por conferir cor característica a suas colônias e aos meios de cultivos onde está presente. Essa bactéria é capaz de utilizar substrato orgânico para realizar seu metabolismo foto-heterotrófico em condições anaeróbias na presença de luz e de crescer fotoautotroficamente, utilizando CO_2 como fonte de carbono e compostos reduzidos de enxofre ou H_2 como doadores de elétrons, tendo crescimento ótimo ao redor de 30°C e pH ótimo entre 6,5 e 7,5 (PONSANO et al., 2003a).

Duas características importantes diferenciam *Rubrivivax gelatinosus* das demais BPNS: a liquefação da gelatina pela ação de uma protease extracelular e a utilização do citrato como única fonte de carbono para o seu crescimento. Por isso, a bactéria conta com uma enzima chave que age sobre o citrato e

libera acetato para, posteriormente, ser utilizado pela bactéria (GARRITY, 2001; PONSANO et al., 2002a; PRASERTSAN et al., 1993a). Essas características viabilizam o crescimento da bactéria em efluentes industriais, permitindo sua despoluição com produção de biomassa.

3 PIGMENTAÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

Aditivos de alimentos são empregados com propósitos diversos, tais como melhorar a cor, estimular o crescimento ou aumentar a lucratividade da criação (NUNES, 1998). Pigmentantes são adicionados às rações animais com a finalidade de promover pigmentação amarelada em canelas, pele, carne, gordura subcutânea e bicos de frangos de corte; alaranjada em gemas de ovos; rosada em filés de trutas e salmão, e vermelha em camarões e lagostas (BAKER; GÜNTHER, 2004; BREITHAUPT, 2007; HUDON, 1994; POLONIO et al., 2010). A pigmentação representa fator de importância econômica para produtores de aves e pescado devido à tradição dos costumes alimentares por parte dos consumidores de cada região do planeta (BAKER; GÜNTHER, 2004; TEIXEIRA, 1997).

O consumidor brasileiro prefere ovos de gema bem amarela e carcaças de frangos e perus mais “coradas” e, devido a essa preferência, as rações de aves geralmente contêm pigmentantes (NUNES, 1998). A pigmentação na gema do ovo é resultado da deposição de pigmentos carotenóides, que podem ser naturais (milho, pimentão vermelho, entre outros), ou sintéticos (cantaxantina e etil éster beta apo-8-caroteno) (GARCIA et al., 2002).

O aumento do consumo de milho na alimentação humana e o preço elevado no mercado internacional têm onerado os custos da produção animal e levado os produtores a buscar outros alimentos para dietas das aves

(CASARTELLI et al., 2005). Porém, a baixa presença de carotenóides em algumas dietas, resulta em gemas de pigmentação muito clara, problema que pode ser resolvido pela inclusão de pigmentantes. Ponsano (2000) estudou a produção de biomassa de bactéria fotossintetizante em águas residuárias de abatedouro avícola como fonte de pigmentos carotenóides alternativos para a pigmentação de aves. Posteriormente, Ponsano et al. (2002b; 2004a) adicionaram biomassa de *R. gelatinosus* em ração de frangos e obtiveram resultados positivos na pigmentação da carne e da pele das aves. Em outros experimentos, o mesmo produto foi adicionado à ração de galinhas poedeiras, promovendo a intensificação da cor das gemas (mais avermelhadas e mais escuras) e atendendo às expectativas do mercado consumidor local (POLONIO, 2007; POLONIO et al., 2010; PONSANO et al., 2003b; 2004b).

Em relação ao pescado, três setores produtivos devem sua existência à riqueza de cores da pele ou carne dos peixes: salmão, carpas ornamentais e peixes tropicais. Quando criados em cativeiro, esses animais não têm acesso a algumas algas e a outras fontes naturais de carotenóides, sendo necessária a adição de pigmentantes para a obtenção da coloração esperada pelo mercado consumidor (STOSKOPF, 1993). Para intensificar a coloração de peixes ornamentais e criados em cativeiro, a adição de carotenóides sintéticos e naturais à dieta também é utilizada (GOUVEIA et al., 2003; PASSOS, 2007; PONCE-PALAFOX et al., 2004).

Alguns peixes devem sua coloração à astaxantina, enquanto que outros possuem carotenóides diferentes, tais como a tunaxantina, luteína, zeaxantina,

cintiazantina (ou aloxantina), pectoxantina (carpa), salmoxantina (salmão), dependendo de sua fonte na alimentação (OGAWA; MAIA, 1999).

4 PRODUTOS OBTIDOS POR BIOTECNOLOGIA APÓS TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

A demanda química de oxigênio (DQO) é um parâmetro global utilizado como indicador do conteúdo orgânico de águas residuárias e superficiais, utilizado no monitoramento de estações de tratamento de efluentes líquidos (AQUINO et al., 2006). Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de reduzir a DQO em efluentes industriais e possibilitar a produção concomitante de biomassa microbiana (CARLOZZI; SACCHI, 2001; GETHA et al., 1998; IZU et al., 2001; PONSANO et al., 2003a; PRASERTSAN et al., 1993a; b; ZHENG et al., 2005 a; b).

Estudos a respeito da produção de biomassa de *Rhodovulum sulfidophilum* em efluente originário do processamento de sardinha determinaram as melhores condições de cultivo para a máxima produção e indicaram a presença de altos teores de proteínas e carotenóides no produto, permitindo sua indicação para uso como suplemento alimentar na criação de peixes e camarões (AZAD et al., 2001; 2003).

Ponsano et al. (2008), Lima; Ponsano (2008) e Lima et al. (2008) desenvolveram métodos para o tratamento de efluentes de indústrias de alimentos utilizando a bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus*. Dessa forma, os autores conseguiram aliar despoluição à produção de pigmentos

fotossintetizantes, oxicarotenóides, presentes junto à massa celular bacteriana obtida no processo.

Ponsano et al. (2003a) analisaram a composição da biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* produzida em efluente de abatedouro de frangos e encontraram a presença de proteínas, carboidratos, minerais e lipídeos, além dos oxicarotenóides. Similarmente, Lima (2009) encontrou concentrações significativas desses nutrientes na biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente de indústria de abate e processamento de pescado durante a aplicação de tratamento despoluente.

De acordo com Norparatnaraporn et al. (1983) e Kantachote et al. (2005), a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* possui potencial como biofertilizante e suplemento para ração animal por possuir aminoácidos e vitaminas. Também Breithaupt (2007) e Ponsano et al. (2002b; 2003b; 2004a; b) sugeriram a aplicação da biomassa bacteriana na formulação de rações animais e na indústria farmacêutica devido ao seu potencial pigmentante.

5 OBJETIVOS

Para que a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* possa ser utilizada como ingrediente de ração animal, é necessário conhecer suas propriedades. Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente de indústria de abate e processamento de pescado em relação a cor, composição centesimal, composição microbiológica e conteúdo de pigmentos carotenóides e aminoácidos.

REFERÊNCIAS

AQUINO, S. F.; SILVA, S. Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 11, n. 4, p. 295-304, 2006.

AUSICH, R. L. Commercial opportunities for carotenoid production by biotechnology. **Pure Appl. Chem.**, v. 69, n. 10, p. 2169-2173, 1997.

AZAD, S. A. et al. Growth and production of biomass of Rhodovulum sulfidophilum in sardine processing wastewater. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.33, n.4, p.264-268, 2001.

AZAD, S. A. et al. Rhodovulum sulfidophilum in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 38, n.1, p. 13-18, 2003.

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial xanthophylls. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.68, n. 4, p. 445-455, 2005.

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. β-Carotene production whit algae. In: VANDAMME, J. E. (Ed). **Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors**. Elsevier: New York, 1989. p. 15-26.

BREITHAUPT, D. E. Modern application of xanthophylls in animal feeding – a review. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 18, n. 10, p. 501-506, 2007.

CARLOZZI, P.; SACCHI, A. Biomass production and studies on *Rhodopseudomonas palustris* grown in an outdoor, temperature controlled, underwater tubular photobioreactor. **J. Biotechnol.**, v. 88, n. 3, p. 239-249, 2001.

CASARTELLI, E. M. et al. Commercial laying hen diets formulated according to different recommendations of total and digestible amino acids. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 7, n. 3, p. 177-180, 2005.

CYRINO, J. E. P. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** São Paulo: TECART, 2004. 533p.

FEOFILOVA, G. I. Fungal carotenoids: their biological functions and pratical use. **Appl. Biochem. Bioeng.**, v. 30, p. 143-153, 1994.

FONTANA, J. D. et al. Carotenóides: Cores atraentes e ação biológica. **Biotecnolog. Cienc. Desenvolv.**, v.2, n.13, p. 40-45, 2000.

FRANCHINI, A.; PADOA, E. I pigmenti nell'alimentazione del pollo da carne. **Riv. Avicolt.**, v. 65, p. 22-30, 1996.

GARCIA, E. A. et al. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v.4, n. 1, p.249-255, 2002.

GARRITY, G. M. (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2001. v. 2.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S.; CHONG, V. C. Isolation and growth of the phototrophic bacterium *rhodopseudomonas palustris* strain B1 in sago-starch-processing wastewater. **World J. Microbiol. Biotechnol**., v. 14, n. 4, p. 505-511, 1998.

GOUVEIA, L. et al. Colouring ornamental fish (Cyprinus carpio and Carassius auratus) with microalgal biomass. **Aquac. Nutr**., n.9, n. 2, p. 123-129, 2003.

HUDON, J. Biotechnological applications of research on animal pigmentation. **Biotecnol. Adv.**, v. 12, n. 1, p. 49-69, 1994.

IZU, K. et al. Aeration conditions affecting growth of purple nonsulfur bacteria in an organic wastewater treatment process. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 24, n. 2, p. 294-302, 2001.

JONHSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 11, p. 297-326, 1995.

KANTACHOTE, D.; TORPEE, S.; UMSAKUL, K. The potencial use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. **Eletron. J. Biotechnol.**, v. 8, n. 3, 2005. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue3/full/8/>. Acessado em: 15 nov. 2009.

LIMA, L. K. F. **Crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* em efluente industrial de abate e processamento de tilápias**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2009.

LIMA, L. K. F.; AVANÇO, S. V.; PONSANO, E. H. G. Caracterização microbiológica e tratamento térmico de resíduo industrial para o cultivo de *Rubrivivax gelatinosus*. **Vet. Zootec.**, v. 15, n. 2, supl. 1, p.116, 2008.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G. Parâmetros de produtividade e redução da carga poluente de efluente industrial de pescado em dois reatores biológicos. **Vet. Zootec.**, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 123, 2008.

MONTEIRO, R. A.; BONIOLO, M. R.; YAMAURA, M. Uso das fibras de coco na biossorção de chumbo em águas residuárias industriais. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleareas** – IPEN. Disponível em: <http://www.ambiente-augm.ufscar.br/uploads/A2-060.pdf>. Acessado em: 18 nov. 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requeriments of fish.** Washington, D.C.: National Academy Press, 1993. 114p.

NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2.ed. rev. aum. Belo Horizonte: FEP-MVZ Editora, 1998. 387p.

NOPARATNARAPORN, N. et al. Single cell protein production from cassava starch by Rhodopseudomonas gelatinosa. **J. Ferment. Technol.**, v.61, p. 515-9, 1983.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca**. São Paulo: Varela, 1999. p 75-85.

PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassa de interesse para a aquicultura.** 2007. 77f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PAULINO, C. Z. **Produção de biomassa por *Rubrivivax gelatinosus* em efluente de abaterouro avícola utilizando métodos industriais.** 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária. Araçatuba, 2006.

PFENNIG, N. Rhodopseudomonas globiformis, sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. **Arch. Microbiol.**, v. 10, p. 197-206, 1974.

POLONIO, L. B. **Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* como suplemento de rações para galinhas poedeiras.** 2007. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2007.

POLONIO, L. B. et al. Utilisation of bacterial (*Rubrivivax gelatinosus*) biomass for egg yolk pigmentation. **Anim. Prod. Sci.**, v. 50, p. 1–5, 2010.

PONCE-PALAFOX, J. T.; ARREDONDO-FIGUEROA, J. L. VERNON-CARTER, E. J. Pigmentacion de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) con carotenoides de flor de cempasuchil (*Tagetes erecta*) en comparacion con la astaxantina. **Rev. Mex. Ingenieria Quimica**, v. 3, p. 219-225, 2004.

PONSANO, E. H. G. **Avaliação da capacidade pigmentante de biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* em frangos de corte.** 2000. 93f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) –Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara, 2000.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 45, n. 4, p. 445 – 449, 2002a.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 46, n. 2. p. 143 – 147, 2003a.

PONSANO, E. H. G.; PAULINO, C. Z.; PINTO, M. F. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 9, p. 3836-3842, 2008.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M. Biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* para a promoção da pigmentação de gemas de ovos. **Rev. Hig. Alim.**, v. 17, n. 104-105, p. 155-156, 2003b.

PONSANO, E. H. G. et al. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 11, n. 1, p. 77–82, 2002b.

PONSANO, E. H. G. et al. Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 6, n. 4, p. 237 – 242, 2004a.

PONSANO, E. H. G. et al. Rhodocyclus gelatinosus biomass for egg yolk pigmentation. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 13, n. 3, p. 421-425, 2004b.

PRASERTSAN, P.; CHOORIT, W.; SUWANNO,S. Isolation, identification and growth conditions of photosynthetic bacteria found in seafood processing wastewater. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 9, n. 5, p. 590-592,1993a.

PRASERTSAN, P.; CHOORIT, W.; SUWANNO,S. Optimization for growth of *Rhodocyclus gelatinosus* in seafood processing effluents. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 9, n. 5, p. 593-596,1993b.

PRASERTSAN, P.; JATURAPORNPIPAT, M.; SIRIPATANA, C. Utilization and treatment of tuna condensate by photosynthetic bacteria. **Pure Appl. Chem.**, v. 69, n. 11, p. 2439-2445, 1997.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências .** 2.ed. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186 p.

STOSKOPF, M. K. **Fish medicine.** Philadelphia: Saunders, 1993. 882p.

TEIXEIRA, A. S. **Alimentos e alimentação dos animais**. 4. ed. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 402p.

TORRISSEN, O.J.; CHRISTIANSEN, R. Requirements for carotenoids in fish diets. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 11, p. 225-230, 1995.

WILLIAMS, W. D. Origin and impact of color on consumer preference for food. **Poult. Sci.**, v. 71, n. 4, p. 744-746, 1992.

ZHENG, S.; YANG, M.; YANG, Z. Biomass production of yeast isolate from salad oil manufactoring wastewater. **Bioresour. Technol.**, v. 96, n. 10, p. 1183-1187, 2005 a.

ZHENG, S. et al. Biomass production from glutamate fermentation wastewater by the co-culture of *Candida halophila* and *Rhodothorula glutinis*. **Bioresour. Technol.**, v. 96, n. 13, p. 1522-1524, 2005 b.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

Potencial de uso de biomassa bacteriana como aditivo de ração de aves e peixes

[Potencial use of bacterial biomass as feed additive for poultry and fish]

Ane Pamela Capucci Torres[1*], Elisa Helena Giglio Ponsano[2]

[1] Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal.
Rua Clóvis Pestana n° 793 - 16050-680 – Araçatuba/SP

[2] Docente do Curso de Medicina Veterinária e Pós-graduação em Ciência Animal. Araçatuba, UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal.

RESUMO

A biomassa produzida pela bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* em águas residuárias provenientes do processamento de pescado foi caracterizada em relação a cor, composição centesimal, composição microbiológica e conteúdo de pigmentos carotenóides e aminoácidos, visando sua aplicação como ingrediente para ração animal. As características composicionais e sensoriais da biomassa de *R. gelatinosus* indicaram baixo nível de contaminação microbiana e alto potencial nutricional e pigmentante.

Palavras-chave: *Rubrivivax gelatinosus*, carotenóides, pigmentos biológicos, efluentes industriais

ABSTRACT

Biomass produced by the phototrophic bacteria Rubrivivax gelatinosus *in fish processing wastewater was characterized for color, proximate composition, microbiological composition and contents of carotenoid pigments and amino acids in order to allow its use as an ingredient in animal feed. Composition and sensorial*

* Autor para correspondência (*corresponding author)*

E-mail: ane_capucci@yahoo.com.br

characteristics of R. gelatinosus *biomass indicated low level of microbial contamination and high nutritional and pigmenting potential.*

Keywords: Rubrivivax gelatinosus, *carotenoids, biological pigments, industrial effluents*

INTRODUÇÃO

A bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus*, antes chamada *Rhodocyclus gelatinosus*, é natural de ambientes aquáticos e efluentes industriais e, sob condições de cultivo adequadas, é capaz de crescer em águas residuárias da indústria de processamento de alimentos de origem animal, reduzindo a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e produzindo massa celular (biomassa) (Prasertsan et al., 1997; Ponsano et al., 2003; Lima e Ponsano, 2008).

Segundo Monteiro et al. (2010) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares biomassa é toda matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana incluindo os materiais procedentes de suas transformações naturais ou artificiais.

Devido à presença de oxicarotenóides em sua composição, a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* apresenta potencial pigmentante, podendo encontrar aplicação na formulação de rações animais com o objetivo de acentuar a coloração de produtos de avicultura e alguns tipos de pescado (Ponsano et al., 2002b, 2003, 2004a; b). Uma coloração intensa contribui para a boa aparência de produtos de origem animal e assim, atrai o consumidor pela relação que traz com sanidade, frescor e valor nutricional (Baker e Günther, 2004; Takahashi et al., 2008). Este fato é especialmente verdadeiro em relação a alguns tipos de pescado, frangos de corte e gema de ovos (Gomes et al., 2002; Ponsano et al., 2004a; b). Além disso, a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* possui aminoácidos e vitaminas, podendo apresentar potencial como biofertilizante e suplemento nutricional para ração animal (Noparatnaraporn et al., 1983; Kantachote et al., 2005).

Os oxicarotenóides são responsáveis pela função pigmentante nos reinos animal e vegetal. Os animais, no entanto, são incapazes de sintetizá-los, mas são capazes de realizar sua absorção, transformação e deposição em vários tecidos (Breithaupt, 2007). Além disso, alguns carotenóides apresentam efeito antioxidante, atuando na prevenção de doenças ateroscleróticas, auxiliam nas funções imunológicas, apresentam atividade

anticarcinogência, modulam a ativação de linfócitos e macrófagos, e agem como pró-vitamínicos, sendo biotransformados em vitamina A, que está diretamente envolvida com reações metabólicas (Katsuyama e Matsuno, 1988; Torrissen e Christiansen, 1995; Bacconi, 2003; Rodrigues et al., 2003). Portanto, o conhecimento das propriedades da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* com vistas à sua utilização como ingrediente para alimentação animal é de fundamental importância.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente de indústria de abate e processamento de pescado em relação a cor, composição centesimal, composição microbiológica e conteúdo de pigmentos carotenóides e aminoácidos, visando sua utilização como aditivo de ração de aves e peixes.

MATERIAL E MÉTODOS

A bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* utilizada nos experimentos foi isolada de efluente de abatedouro avícola e caracterizada com base em testes bioquímicos, morfológicos e pelo espectro de absorção de pigmentos fotossintetizantes, de acordo com o descrito por Ponsano et al. (2002a), permanecendo armazenada a 5°C em meio de Pfennig semissólido (Pfennig, 1974) até o momento do uso.

O efluente líquido utilizado como substrato para o cultivo de *Rubrivivax gelatinosus* foi obtido junto à indústria Tilápia do Brasil, situada em Buritama/SP, onde é realizado o abate e o processamento de tilápias. Após ser submetido ao gradeamento na indústria, o efluente foi colhido e transportado ao laboratório em bombonas plásticas, onde foi filtrado, tratado a 65ºC/30 min em tanque de pasteurização lenta (Incomar/TL500) e imediatamente resfriado para 30ºC, tornando-se apto a receber o inóculo bacteriano.

O produto *Carophyll Red*® (cantaxantina 10%) (DSM, 2009), comumente utilizado como pigmentante em rações animais foi obtido do comércio local e utilizado para a comparação dos atributos de cor.

Para o preparo do inóculo inicial, uma alçada da cultura de *Rubrivivax gelatinosus* foi transferida do meio semissólido para tubos de vidro de boca esmerilhada contendo meio de Pfennig líquido acrescido de soluções nutrientes de microelementos, biotina 0,0015% e tiamina-HCl 0,005% (Ponsano et al., 2003). Os tubos foram

completamente preenchidos para fornecer atmosfera de anaerobiose. O cultivo foi incubado em estufa DBO a 30 ± 2ºC com 1.400 ± 200 lux até atingir densidade ótica de 0,5 a 600 nm. A partir daí, um novo inóculo foi realizado (1% v/v) em meio de Pfennig líquido acrescido das soluções nutrientes e vitamínicas e a incubação foi realizada nas mesmas condições citadas anteriormente, constituindo-se no inóculo final de *R. gelatinosus*.

Para a produção da biomassa, o substrato tratado foi transferido para reatores de vidro, onde recebeu o inóculo final de *Rubrivivax gelatinosus* em nível de 1% (v/v). Os reatores foram completamente preenchidos a fim de se obter atmosfera de anaerobiose e o cultivo foi realizado a 2.000 ± 500 lux, sob temperatura de 30 ± 5ºC durante 10 dias. Ao final do período de produção, todo o cultivo foi microfiltrado em sistema com unidade de filtração de 0,75 m^2 e porosidade de 0,2 μm (Frings), sob vazão de 1,5 m^3/h e pressão de 1,5 bar. O retentado resultante da filtração foi centrifugado durante 30 min (Incibrás/Spin VI) a 3.400 g e 5°C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi congelado a -20°C e submetido à liofilização (Liobrás/L101) durante 48 horas. O material seco obtido foi pulverizado em almofariz, dando origem à biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, que foi pesada e armazenada a vácuo e ao abrigo da luz para as análises posteriores. Foram realizadas seis produções da biomassa e todas as análises descritas em seguida foram realizadas em duplicata para cada uma das amostras obtidas.

A caracterização microbiológica da biomassa foi realizada pela determinação dos seguintes grupos microbianos (Vanderzant e Splittstoesser, 1992): bactérias mesófilas aeróbias e facultativas viáveis, coliformes a 35°C e a 45°C, bolores e leveduras, estafilococos coagulase positivo, *Salmonella* sp. e *Aeromonas* sp.

Para a determinação da composição centesimal da biomassa, foram realizadas as seguintes determinações: umidade, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo (Association of Official Analytical Chemists, 1995). A concentração de extrativo não nitrogenado e contaminantes foi determinada por diferença.

A composição em aminoácidos foi determinada pelo método da derivação pós-coluna por *orto*-ftalaldeído (Shimadzu LC-10ª/C-47A). O sistema foi calibrado com mistura padrão de aminoácidos, obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos das amostras. Os peptídeos (0,2 – 1 mg) foram hidrolisados em 1 mL de

HCl 6 mol/L, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H_2O, a 110°C por 72 horas em atmosfera de N_2. Após a hidrólise, o material foi concentrado a vácuo, dissolvido em tampão de diluição NaS, pH 2,2 e filtrado (Millipore/GV Millex) antes de ser injetado no aparelho. Para o cálculo da proporção relativa dos aminoácidos da amostra, determinou-se a relação entre as suas concentrações unitárias e a média (Fountoulakis e Lahm, 1998).

Os atributos de cor *L* (luminosidade), *C* (intensidade da cor) e *h* (tom), foram obtidos para a biomassa e para o produto comercial Carophyll Red pela média de três pulsos consecutivos da câmara ótica do espectrofotômetro Hunterlab Miniscan XE Plus, calibrado com padrões branco e preto, utilizando-se área de abertura de visão de uma polegada, iluminante D_{65} e ângulo de 10° para o observador (Commission Internationale de l'Éclairage, 1986).

A técnica de recuperação de carotenóides totais foi adaptada da metodologia descrita por Valduga (2005). Para isso, 0,1 g da biomassa foi triturada em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Ao material triturado, foram adicionados 3 mL de dimetilsulfóxido e o conteúdo obtido foi transferido para tubo de ensaio onde se procedeu à maceração a 55°C/30 min com pulsos intermitentes de ultrassom de 40 kHz (Unique/USC 1800A) intercalados a agitações periódicas (Phoenix/P-56). Em seguida, o conteúdo do tubo foi adicionado de 3 mL da mistura acetona:metanol (7:3, v/v) e centrifugado (3.400 g, 5°C, 10 min) e o sobrenadante obtido foi transferido para balão volumétrico de 50 mL. Foram realizadas extrações sucessivas, até que o solvente e as células perdessem totalmente a coloração. O volume do balão volumétrico foi completado para 50 mL com metanol e, a partir desta solução, foram preparadas diluições 1:5 e 1:10 (v/v), também em metanol, para a quantificação dos pigmentos a 448 nm (Hitachi/U-1900), que corresponde ao comprimento de onda médio dos máximos de absorbância dos oxicarotenóides da bactéria. A concentração total de carotenóides foi estimada segundo a equação descrita por Davies (1976) e o coeficiente de absorbância utilizado foi o referente a carotenóides (Liaaen-Jensen e Jensen, 1971).

A estatística descritiva foi adotada para os dados de composição microbiológica e centesimal, conteúdo de pigmentos carotenóides e aminoácidos. Para verificar a diferença entre as médias dos atributos de cor foi utilizado o teste t não-paramétrico,

utilizando-se software GraphPad InStat Versão 3.06 (Vieira, 1999). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas estão descritos na Tab. 1. Por não existirem padrões microbiológicos de referência para ingredientes de rações, os dados obtidos foram comparados às exigências da Resolução da Diretoria Colegiada n° 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 12/2001 – ANVISA), que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos de consumo humano no item "Aditivos intencionais, coadjuvantes de tecnologia e similares", que abrangem os corantes à base de sangue e derivados (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001).

O grupo dos coliformes a 35°C indica a qualidade higiênica, enquanto que o grupo dos coliformes a 45°C indica a qualidade sanitária dos produtos, já que nesse último grupo estão incluídas espécies cujo habitat é o trato gastrointestinal (Vieira, 2003). De acordo com a RDC 12/2001 - ANVISA, consideram-se toleráveis nesses produtos contagens de até 10 coliformes a 45°C por grama e 10^2 UFC de estafilococos coagulase positiva por grama, não sendo permitida a presença de *Salmonella* sp. em 25g (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001). Portanto, os resultados encontrados para esses grupos microbianos atendem aos requisitos da legislação. Indicam baixa contagem de coliformes a 35°C e as práticas utilizadas na produção e na manipulação do produto atendem a princípios de higiene apontando para a segurança da utilização da biomassa em alimentação animal.

A pasteurização realizada no preparo do substrato contribuiu para reduzir a contaminação, pois, tem como principal objetivo a total destruição dos microrganismos patogênicos com emprego de calor seguido de resfriamento, sem alteração da constituição física e química do meio (Jerônimo, 2005).

Tabela 1 – Análise microbiológica da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*[1]

Grupo microbiano	Biomassa
Bactérias mesófilas aeróbias e facultativas viáveis (UFC*/g)	$5,3 \times 10^6$
Coliformes a 35°C (NMP**/g)	20,27

Coliformes a 45°C (NMP/g)	< 1,0
Bolores e leveduras (UFC/g)	$1,2 \times 10^3$
Estafilococos coagulase positivo (UFC/g)	Negativo
Aeromonas sp.	Negativo
Salmonella sp.	Ausência em 25g

[1]Valores médios. [*]Unidades Formadoras de Colônia; [**]Número Mais Provável.

Apesar de inexistirem padrões para bactérias mesófilas aeróbias na legislação, pode-se dizer que os valores encontrados são considerados aceitáveis, considerando que a temperatura durante o processo de produção da biomassa esteve situada na faixa entre 25 e 35°C (30 ±5°C), que coincide com a faixa de temperatura ótima para a multiplicação de mesófilos (Franco e Landgraf, 1996). De acordo com Agnese et al. (2001), contagens da ordem encontrada podem ser consideradas normais para alimentos não processados.

Segundo a RDC 12/2001 - ANVISA, para a maioria dos alimentos destinados ao consumo humano são toleradas contagens de até 10^4 UFC de bolores e leveduras por grama (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001). Como esses organismos são considerados indicadores da condição higiênica da produção de alimentos (Franco e Landgraf, 1996), os resultados encontrados confirmam as boas práticas utilizadas na produção.

A ausência de *Salmonella* sp., *Aeromonas* sp. e estafilococos coagulase positivo reforça essa segurança, pois algumas espécies desses microrganismos são considerados patogênicos para homens e animais (Esposto et al., 2007).

A composição centesimal da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* descrita na Tab. 2 indica o potencial de uso do produto no arraçoamento de diferentes espécies animais em função de sua concentração protéica e energética.

Tabela 2 – Composição centesimal da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente industrial de pescado[1]

Componente	%

Umidade	4,55 ± 0,84
Matéria mineral	4,05 ± 0,66
Proteína bruta	57,39 ± 2,81
Extrato etéreo	11,08 ± 1,41
Extrativo não nitrogenado e contaminantes	22,93 ± 1,95

[1] Valores médios e respectivos desvios padrões.

Os animais devem receber, durante toda a vida, uma quantidade mínima diária de proteínas para atender às suas necessidades, que podem ser para crescimento, produção e manutenção, pois são fundamentais para os processos vitais das células (Andriguetto et al., 1990). Rações para peixes devem conter entre 24 e 50% de proteína bruta, conforme a espécie, a fase de desenvolvimento e o tipo de ambiente (água quente ou fria, doce ou salgada) (El-Sayed e Teshima; 1992; Furuya et al., 2001; Cyrino et al., 2004). Já para frangos de corte, de acordo com Rostagno (2005), os requisitos de proteína bruta na ração são de 17 a 22% conforme a idade da ave. Além disso, Cowey e Walton (1988) relatam a importância da presença de lipídeos na dieta de peixes, e recomendam de 5 a 10% de lipídeos para peixes de água quente.

A composição em aminoácidos da biomassa está descrita na Tab. 3 e indica a presença de vários dos aminoácidos considerados essenciais para diversas espécies animais, como metionina, lisina, fenilalanina, valina, entre outros (Andriguetto et al., 1990; Cyrino et al., 2004). Também na Tab. 3 são citadas as concentrações de aminoácidos de ingredientes de ração para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Furuya et al., 2001). Pela comparação dos valores apresentados, pode-se verificar que a superioridade das concentrações de aminoácidos na biomassa de *R. gelatinosus* permite sua indicação como fonte de aminoácidos na composição das rações para peixes.

Os animais necessitam receber quantidades suficientes de aminoácidos essenciais para ter bom crescimento, produzir neurotransmissores e regular a síntese protéica, dentre outras funções (Andriguetto et al., 1990). Para que isso ocorra, é preciso que haja o balanceamento entre aminoácidos essenciais e não essenciais específico para cada fase da vida dos animais (Storebakken et al., 2000; Cyrino et al., 2004).

Tabela 3 – Composição em aminoácidos da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente de abatedouro de pescado, do farelo de soja e da farinha de peixe

Componente	Biomassa [1] (g/100g)	Farelo de soja [2] (g/100g)	Farinha de peixe [2] (g/100g)
Ácido aspártico	5,70 ± 2,35	-	-
Treonina	3,82 ± 1,50	1,53	0,45
Serina	2,81 ± 0,96	0,74	2,63
Ácido glutâmico	6,40 ± 2,29	-	-
Prolina	2,93 ± 1,02	0,96	3,61
Glicina	3,46 ± 1,51	0,79	4,78
Alanina	5,32 ± 2,28	0,71	3,67
Valina	4,39 ± 1,84	0,44	3,32
Metionina	0,66 ± 0,29	0,27	0,55
Isoleucina	3,33 ± 1,43	0,55	1,90
Leucina	7,08 ± 2,41	0,54	3,42
Tirosina	2,56 ± 0,96	0,36	1,08
Fenilalanina	3,43 ± 1,31	0,35	1,86
Histidina	1,92 ± 0,74	0,38	1,09
Lisina	4,52 ± 1,76	0,58	2,64
Arginina	3,85 ± 1,29	0,92	3,75

[1] Valores médios e respectivos desvios padrões.

[2] Composição em aminoácidos de ingredientes de ração para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus)* (Furuya et al., 2001).

A deficiência em aminoácidos essenciais em peixes provoca redução na utilização da proteína, retarda o crescimento, diminui o ganho de peso e a eficiência alimentar e reduz a resistência a doenças (Cyrino et al., 2004). Para aves, são importantes a glicina na formação do ácido úrico, a prolina, na formação de penas, além

de metionina, lisina, fenilalanina, triptofano, treonina, valina, leucina, isoleucina, histidina e arginina, para vários outros processos metabólicos (Lana, 2005). Portanto, a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* tem o potencial de fornecer quase todos os aminoácidos considerados essenciais para peixes e aves, com exceção do triptofano, o que sugere sua aplicação na ração desses animais.

Na Tab. 4 estão demonstrados os atributos de cor da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* e do produto comercial *Carophyll Red*®.

Os valores de *L* vão de 0 (preto) a 100 (branco) e indicam a luminosidade do produto. Já o atributo *C* indica a intensidade da cor e, quanto maior seu valor, maior a saturação da cor. O atributo *h*, por sua vez, indica o tom da cor e é dado por uma medida angular, de modo que aumentos em seu valor no sentido anti-horário representam mudanças de cor que passam por vermelho (0°), amarelo (90°), verde (180°) e azul (270°). Os atributos de cor avaliados não diferiram estatisticamente entre os dois produtos analisados (P>0,05), indicando que ambos são igualmente escuros, apresentam mesma tonalidade vermelha e mesma intensidade de cor.

Tabela 4 – Parâmetros de medida da cor (*L*, luminosidade; *C*, intensidade da cor; *h*, tom)[1]

Parâmetro de cor	Biomassa de *R. gelatinosus*	*Carophyll Red*®
L	22,42 ± 2,45 [NS]	22,25 ± 0,61
C	14,22 ± 2,94 [NS]	16,66 ± 0,07
h	25,48 ± 8,30 [NS]	21,58 ± 0,47

[1] Valores médios e respectivos desvios padrões. [NS] Valores não significativos (P > 0,05) entre biomassa de *R. gelatinosus* e *Carophyll Red*®.

A composição média de carotenóides da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida em efluente de indústria de pescado foi de 3,03 ± 0,44 mg de carotenóides/g de biomassa, semelhante aos valores obtidos por Prasertsan et al. (1997) para *Rhodocyclus gelatinosus* R7 produzida em efluente de indústria de processamento de atum cozido, que estiveram entre 2,13 e 3,90 mg de carotenóides/g de biomassa seca.

Baker e Günther (2004) relatam que, para produzir o salmão, são adicionados carotenóides na dieta com a finalidade de acentuar a coloração do alimento e atrair o

consumidor final. Segundo Torrissen e Christiansen (1995), a demanda do mercado consumidor alemão requer concentrações de 6 a 7 mg de carotenóides (astaxantina)/kg de carne em salmão do Atlântico. Oxicarotenóides também são utilizados para a produção de peixes ornamentais visando incrementar a aparência da pele. Na criação de *Cyprinus carpio* da variedade vermelha (*Kawari*), por exemplo, Gouveia et al. (2003) citam a utilização dos carotenóides naturais contidos na biomassa da microalga de *Chlorella vulgaris* para aumentar a pigmentação.

Para produtos de avicultura, a prática da adição de pigmentantes à ração varia de acordo com as exigências do mercado consumidor (Ponsano et al, 2002a; b; 2003; 2004a; b). Ponsano et al. (2002b; 2004a, b) avaliaram a cor de carcaças de frangos e de gemas de ovos quando as aves receberam suplementação com biomassa de *Rhodocyclus gelatinosus* produzida em efluente de indústria de abate de frangos e concluíram que a utilização do produto conferiu pigmentação à carne do peito e às gemas. Esse efeito apresenta relevância nos mercados consumidores que demandam produtos de coloração mais acentuada, como é o caso de México, Bélgica, Itália, Peru e algumas regiões do Brasil, entre outros, justificando a adição de pigmentantes na fase de produção animal (Gouveia et al., 1996; Toyomizu et al., 2001). Em experimentos realizados por Garcia et al. (2002) a adição de 60 ppm de cantaxantina na dieta de aves de postura melhorou de forma quadrática a coloração das gemas, sem influenciar os parâmetros produtivos e demais características de qualidade dos ovos de poedeiras comerciais.

Portanto, a partir dos resultados obtidos, verifica-se que os carotenóides contidos na biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida no efluente de indústria de processamento de pescado podem, também, contribuir para a pigmentação de produtos animais quando adicionada à ração.

CONCLUSÕES

A determinação da composição e das características sensoriais da biomassa de *R. gelatinosus* indicaram baixo nível de contaminação microbiana e alto potencial em nutrientes e pigmentos, apontando positivamente para sua utilização como ingrediente nutricional e pigmentante na criação de animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n° 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01_anvisa. pdf>. Acessado em: 06 ago. 2009.

AGNESE, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; SILVA, P. P. O. et al. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais em peixes frescos comercializados no município de Seropédica – RJ. *Hig. Aliment.*, v. 15, n. 88, p. 67-70, 2001.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I. et al. A. *Nutrição animal*. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 395p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. *Official methods of analysis*. 16. ed. Washington, D.C., 1995.

BACCONI, D. F. *Exigência nutricional de vitamina para alevinos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)*. 2003. 31f. Dissertação (Mestrado em Agronomia na área de Ciência Animal e Pastagem) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

BAKER, R.; GÜNTHER, C. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 15, n. 10, p. 484-488, 2004.

BREITHAUPT. D. E. Modern application of xanthophylls in animal feeding: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 18, n. 10, p.501-506, 2007.

COMMISION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE. Technical Report, Colorimetry, *Publ. CIE* 15.2-*1986*, CIE Central Bureau Vienna, Austria.

COWEY, C. B.; WALTON, M. J. Studies on the update of (^{14}C) aminoacid derived from both dietary (^{14}C) protein and dietary (^{14}C) aminoacids by rainbow trout, Salmon gairdneri. *J. Fish Biol.*, v. 33, n. 3, p. 293-305, 1988.

CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M. et al. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TECART, 2004. 533p.

DAVIES, B. H. Carotenoid. In: GOODWIN, T. W. (ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.

DSM Nutritional Products. Canthaxantin. Disponível em: <http://www. dsm. com/en_US/html/dnp/prod_caro_cantha. htm.>. Acessado em: 29 abr. 2009.

EL-SAYED, A.F.M.; TESHIMA. S. Protein and energy-requirements of Nile tilapia, Oreochromis niloticus, Fry. *Aquaculture*, v. 103, n. 1, p. 55-63, 1992.

ESPOSTO, E. M.; SILVA, W. C. P.; REIS, C. M. F. et al. Enteropatógenos bacterianos em peixes criados em uma estação de reciclagem de nutrientes e no ecossistema relacionado. *Pesq. Vet. Bras.* v. 27, n. 4, p. 144-148, 2007.

FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H. W. Hydrolysis and amino acid composition of proteins. *J. chromatogr. A.* v. 826, p. 109-134, 1998.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; PEZZATO, A. C. et al. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus). *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, v. 30, n. 4, p. 1143-1149, 2001.

GARCIA, E. A.; MENDES, A. A.; PIZZOLANTE, C. C. et al. Efeito dos níveis de cantaxantina na dieta sobre o desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.4, n. 1, p.249-255, 2002.

GOMES, E.; DIAS, J.; SILVA, P. et al. Utilization of natural and synthetic sources of carotenoids in the skin pigmentation of gilthead seabream (Sparus aurata). *Eur. Food. Res. Technol.*, v. 214, p.287-293, 2002.

GOUVEIA, L.; VELOSO, V.; REIS, A. et al. Chlorella vulgaris used to colour egg yolk. *J. Sci. Food Agric.*, v. 70, n. 2, p. 167-172, 1996.

GOUVEIA, L.; REMA, P.; PEREIRA, O. et al. Colouring ornamental fish (Cyprinus carpio and Carassius auratus) with microbalgal biomass. *Aquac. Nutr.*, n.9, p. 123-129, 2003.

JERÔNIMO, M. *O cotidiano no ensino do processamento de queijos: recursos instrucionais alternativos.* 2005. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Agronomia, Seropédica, 2005.

KANTACHOTE, D.; TORPEE, S.; UMSAKUL, K. The potencial use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. *Eletron. J. Biotechnol.*,

v. 8, n. 3, 2005. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue3/full/8/>. Acessado em: 15 nov. 2009.

KATSUYAMA, M.; MATSUNO, T. Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids, β-carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin, lutein and tunazanthin in tilapia Tilapia nilotica. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 90B, n. 1, p. 131-139, 1988.

LANA, R. P. *Nutrição e alimentação animal*. Viçosa: UFV, 2005. 344p.

LIAAEN-JENSEN, N.; JENSEN, A. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues: total carotenoid content. In: PIETRO, A.S. *Methods in Enzimology:* Photosynthesis and nitrogen part A. New York: Elsevier, 1971. Cap. 56, p. 586-602.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G. Parâmetros de produtividade e redução da carga poluente de efluente industrial de pescado em dois reatores biológicos. *Vet. Zootec.*, v.15, n.2, supl. 1, p.123, 2008.

NOPARATNARAPORN, N.; NISHIZAWA, Y.; HAYASHI, M. et al. Single cell protein production from cassava starch by Rhodopseudomonas gelatinosa. *J. Ferment. Technol.*, v.61, p. 515-9, 1983.

PFENNIG, N. Rhodopseudomonas globiformis, sp. n., a new species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.*, v. 10, p. 197-206, 1974.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of Rhodocyclus gelatinosus biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 46, n. 2. p. 143 – 147, mar. 2003.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of Rhodocyclus gelatinosus from poultry slaughterhouse wastewater. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 45, n. 4, p. 445 – 449, dez. 2002a.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M. et al. Evaluation of Rhodocyclus gelatinosus biomass for broiler pigmentation. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 11, n. 1, p. 77–82, 2002b.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M. et al. Performance and color of broilers fed diets containing Rhodocyclus gelatinosus biomass. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 6, n. 4, p. 237 – 242, 2004a.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M. et al. Rhodocyclus gelatinosus biomass for egg yolk pigmentation. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 13, n. 3, p. 421-425, 2004b.

PRASERTSAN, P.; JATURAPORNPIPAT, M.; SIRIPATANA, C. Utilization and treatment of tuna condensate by photosynthetic bacteria. *Pure Appl. Chem.*, v. 69, n. 11, p. 2439-2445, 1997.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. *Rev. Nutr.*, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

ROSTAGNO, H. S. *Tabelas brasileiras para aves e suínos:* composição de alimentos e exigências nutricionais. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005. p. 17- 94.

STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K. D.; BAEVERFJORD, G. A. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. *Aquaculture*, v. 184, p. 115-132, 2000.

TAKAHASHI, N. S.; TSUKAMOTO, R. Y.; TABAT, Y. A. et al. Truta salmonada. *Panor. Aquic.*, p. 28-33, 2008.

TORRISSEN, O. J.; CHRISTIANSEN, R. Requirements for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichthyol.*, v. 11, p. 225-230, 1995.

TOYOMIZU, M.; SATO, K.; TARODA, H. et al. Effects of dietary spirulina on meat colour in muscle of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.*, v. 42, n. 2, p. 197-202, 2001.

VALDUGA, E. *Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por Sporodiobolus salmonicolor CBS 2636*. 2005. 189f. Tese (Doutorado em Engenharia Química na sub-área de Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1291p.

VIEIRA, R. H. S. F. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado:* teórica e prática. São Paulo: Varela, 2003. 380p.

VIEIRA, S. *Estatística experimental.* 2. ed. São Paulo: Atlas, 1999.

ANEXO A – Normas para o envio de artigo à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Política editorial

Publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção

especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da

expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res*., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. *Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed).

Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: *National Academy of Sciences*, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <http://www. org/critca16.htm>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related Articles/>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Submissão dos trabalhos

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico
www.abmvz.org.br