

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

VIABILIDADE ECONÔMICA DO PROCESSO DE
OBTENÇÃO DE BIOMASSA PIGMENTANTE DE
Rubrivivax gelatinosus

Leandro Kanamaru Franco de Lima

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**VIABILIDADE ECONÔMICA DO PROCESSO DE
OBTENÇÃO DE BIOMASSA PIGMENTANTE DE**
Rubrivivax gelatinosus

Leandro Kanamaru Franco de Lima
Orientador: Profa. Dra Elisa Helena Giglio Ponsano

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

ARAÇATUBA – SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA / UNESP

L732v Lima, Leandro Kanamaru Franco de
Viabilidade econômica do processo de obtenção de
biomassa pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus* / Leandro
Kanamaru Franco de Lima. – Araçatuba : [s.n.], 2015
83 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de,
Mesquita Filho" Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientadora: Prof. Adj. Elisa Helena Giglio Ponsano

1. Biomassa. 2. Carotenoides. 3. Bactéria. 4. Economia 5.
Efluente de indústria pesqueira. 6. Biotecnologia. I. T.

CDD 664.94



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Viabilidade econômica do processo de obtenção de biomassa pigmentante de
Rubrivivax gelatinosus.

AUTOR: LEANDRO KANAMARU FRANCO DE LIMA

ORIENTADORA: Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO

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

Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA

Dr. RICARDO BORGHESI

Dra. MÁRCIA MARINHO

Dra. LUZIA HELENA QUEIROZ

Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO

DATA DA REALIZAÇÃO: 21 de agosto de 2015.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LEANDRO KANAMARU FRANCO DE LIMA - nascido em 23 de março de 1983 no município de São Paulo/SP. Em 2002, iniciou o curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/SP da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FMVA/UNESP e formou-se no ano de 2006. Durante a graduação, foi bolsista Tortuga Cia. Zootécnica Agrária no convênio Fundunesp-Tortuga no período de 01/07/2004 a 30/06/2005 e realizou estágios de treinamento e de iniciação científica em Zootecnia I e II, Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais e Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Em 2007, iniciou o curso de pós-graduação em Ciência Animal na FMVA/UNESP, na área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal. Nesse período, atuou como bolsista e membro discente da comissão organizadora do I e II curso de especialização em Gestão de Sistemas de Produção Animal na FMVA/UNESP. Em 2009, obteve o título de mestre e, no ano seguinte, tornou-se pesquisador da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas/TO, onde tem atuado desenvolvendo pesquisas na área de aproveitamento agroindustrial de espécies aquícolas. Em 2013, iniciou o curso de doutorado do programa de pós-graduação em Ciência Animal na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Juliana Natiyo Kanamaru (*in memoriam*) ...

Sempre me incentivou.

Sempre acreditou em mim.

Estará eternamente comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que tenho conquistado nessa caminhada, pois ELE é meu refúgio, ELE é minha fortaleza e NELE confiarei.

Agradeço à minha esposa Silmara Sanae Sakamoto de Lima. A cada dia superando os desafios ao meu lado e compartilhando momentos de alegrias e tristezas que aparecem em nossas vidas. Tem sido a maior força para que eu pudesse superar todas as dificuldades que aconteceram durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais José Franco de Lima e Elena Hiromi Kanamaru de Lima, irmã Milena Franco de Lima, madrinha Mitiko Kanamaru e sogros Shigueaki Sakamoto e Kazuko Sakamoto. Pessoas importantes e a quem devo eterna gratidão por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo Nº 50274-4/2011) pelo auxílio financeiro dado a este projeto de doutorado.

À Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas/TO, em especial aos pesquisadores Carlos Magno Campos da Rocha, Ariovaldo Luchiari Junior e Eric Routhledge, pelo apoio e pela confiança depositada em mim para a concretização dessa importante etapa da minha vida profissional.

À Embrapa Agropecuária Oeste, em especial ao Pesquisador Dr. Ricardo Borghesi pela amizade e pela participação na defesa da tese de doutorado.

Ao Instituto Tecnológico de Alimentos, Tecnolat/ITAL, Campinas/SP, em especial aos pesquisadores Manuel Carmo Vieira e José Roberto Cavichiollo pelos ensinamentos durante a realização das análises econômicas do projeto.

Ao Entreposto de pescado Geneseas Aquaculture por acreditar no nosso trabalho para a realização das atividades de campo e coleta de material.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba/SP. Em especial aos professores Dra. Márcia Marinho, Dr. Max José de Araújo Faria Junior, Dra. Luzia Helena Queiróz e Dra. Sílvia Helena Venturolli Perri pela enorme contribuição prestada no Exame Geral de Qualificação e na defesa da tese de doutorado.

Ao Laboratório de Análises de Alimentos, em especial aos funcionários Alexandre Teixeira e Wellington Tonon. Pessoas únicas, grandes amigos e que contribuíram significativamente para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Pesquisador Dr. Alex Akira Nakamura meus sinceros agradecimentos pela verdadeira amizade e participação na banca de defesa da tese de doutorado.

Aos Pós-graduandos e amigos: Karline Tikae Tani Murakami, Thiago Grassi e Edson Francisco do Espírito Santo, pelo companheirismo e pelo apoio durante a realização das análises no Laboratório de Análises de Alimentos.

Aos funcionários da biblioteca e da pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/UNESP e profissionais das instituições envolvidas com este projeto que contribuíram indiretamente para o sucesso dos trabalhos.

Agradecimento especial:

Profa. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano, não caberia nesse papel e nem seria justo apenas descrever em linhas a admiração e o agradecimento que tenho pela pessoa incomparável e que será para sempre um exemplo de responsabilidade e profissionalismo.

SUMÁRIO

	Pág.
SUMÁRIO.....	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS.....	
RESUMO.....	
SUMMARY.....	
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	08
1 Introdução.....	08
2 Revisão de literatura.....	09
2.1 Pigmentos carotenoides.....	09
2.2 Pigmentos comerciais.....	11
2.3 Pigmentos na aquicultura.....	13
2.4 Fontes naturais de pigmentos carotenoides.....	16
2.5 Biomassa pigmentante de <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	18
2.6 Viabilidade econômica em processos de obtenção de pigmentos microbianos.....	20

Referências.....	23
CAPÍTULO 2 – PRÉ-TRATAMENTO DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MASSA CELULAR DE <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	
1 Introdução.....	33
2 Material e método.....	35
3 Resultados e discussão.....	38
5 Conclusão.....	43
6 Referências.....	44
CAPÍTULO 3 – VIABILIDADE ECONÔMICA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOMASSA PIGMENTANTE DE <i>Rubrivivax gelatinosus</i>	
1 Introdução.....	50
2 Material e método.....	53
3 Resultados e discussão.....	59
4 Conclusão.....	69
5 Referências.....	69
APÊNDICE A - Normas para o envio de artigo à revista <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i>	
	76

LISTA DE FIGURAS

Pág.

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Produtividade e recuperação de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* cultivada em efluente industrial de processamento de tilápias..... 41

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Ilustração dos tanques de captação de efluente industrial do processamento de pescado para o planejamento do cultivo de *Rubrivivax gelatinosus* nos biorreatores e recuperação de biomassa..... 56
- Figura 2 - Variação da taxa mínima de atratividade (TMA) anual para os cálculos do valor presente líquido (VPL) no projeto para obtenção de produto pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus* no interior do estado de São Paulo, 2014..... 67

LISTA DE TABELAS

Pág.

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Características físico-químicas dos efluentes utilizados para o cultivo de *Rubrivivax gelatinosus* e percentual de redução da demanda química de oxigênio (DQO) após os tratamentos com o sistema de microfiltração..... 39
- Tabela 2 - Características da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida nos diferentes tratamentos..... 43

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Estimativas do investimento total para uma unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* no interior do estado de São Paulo, 2014..... 61
- Tabela 2 - Estimativas do custo operacional efetivo (COE), custo operacional total (COT) e custo total de produção (CTP) anuais para uma unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* no interior do estado de São Paulo, 2014..... 62
- Tabela 3 - Custos unitários e lucros econômicos para cada unidade do produto pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus* considerando seu valor de venda 70% do menor preço 63

praticado pela concorrência no interior do estado de São Paulo, 2014.....

- Tabela 4 - Indicadores financeiros e econômicos para um projeto de unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* considerando o preço de venda da biomassa 70% do menor preço encontrado no mercado para o produto sintético pigmentante..... 66
- Tabela 5 - Indicadores econômicos para um projeto de unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* considerando variações do preço de venda da biomassa em relação ao menor preço encontrado no mercado para o produto sintético pigmentante..... 68

VIABILIDADE ECONÔMICA DA OBTENÇÃO DE BIOMASSA PIGMENTANTE DE *Rubrivivax gelatinosus*

RESUMO – *Rubrivivax gelatinosus*, uma bactéria fotossintetizante com reconhecido potencial biotecnológico, foi cultivada em efluente para a realização de estudos sobre a produção de massa celular, rendimento, produtividade, Demanda Química de Oxigênio (DQO) e viabilidade econômica do processo em escala industrial. Inicialmente, diferentes concentrações do substrato foram realizadas com o objetivo de aumentar a produtividade e a recuperação da biomassa utilizando um sistema de microfiltração ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ do volume inicial). Os cultivos anaeróbios foram realizados em biorreatores (50 L), com 1.500 ± 200 lux e $32 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cinco dias. A biomassa foi recuperada por microfiltração, desidratada por liofilização e analisada para determinação da composição centesimal. O estudo da viabilidade econômica considerou recursos para estimar desembolsos e receitas previstos para ocorrer durante 10 anos. Os principais indicadores de viabilidade econômica analisados foram: o Valor Presente Líquido (VPL), a Taxa Interna de Retorno (TIR) e o *payback*. Os resultados indicaram maior recuperação de biomassa ($28,61 \pm 0,71$ g) e produtividade ($0,1144$ g biomassa L^{-1} dia^{-1}) no cultivo com maior quantidade de matéria orgânica. A maior redução de DQO foi de 69,23%. A composição centesimal revelou semelhanças entre os tratamentos, à exceção dos lipídeos e proteínas que foram maiores no cultivo mais concentrado. O total de biomassa produzida em um ano seria de 9,58 toneladas. O investimento total seria de R\$ 6.361.456,51 a um custo operacional anual de R\$ 2.366.131,38 e uma receita anual de R\$ 3.870.913,15. Com esses valores, os indicadores TIR e VPL foram de 23,70% ao ano e R\$ 4.466.192,26, respectivamente, o que demonstrou viabilidade do projeto, sendo possível recuperar o capital investido em até quatro anos de atividade industrial.

Palavras-Chave: Carotenoides, Economia, Bactéria, Biotecnologia, Efluente de Indústria Pesqueira, Massa celular

ECONOMIC VIABILITY OF THE PROCESS TO OBTAINING BIOMASS OF *Rubrivivax gelatinosus*

SUMMARY – *Rubrivivax gelatinosus*, a phototrophic bacterium with recognized biotechnological potential, was cultivated in the fish industry effluent to assess studies on cell mass production, yield, productivity, Chemical Oxygen Demand (COD) and economic viability of a project to produce bacterial biomass on an industrial scale. Initially, different concentrations of the substrate were performed with the purpose of increasing the productivity and the biomass recovery ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ and $\frac{3}{4}$ the initial volume) using microfiltration. Cultivations was accomplished in bioreactors (50 L), at $1,500 \pm 200$ lux, $32 \pm 2^\circ\text{C}$ during 5 days. The biomass was recovery by microfiltration then freeze-dried. Later, the biomass samples were analyzed regarding to proximate composition. Thus, an analysis was developed to assess the resources necessary to estimate costs and revenue that might occur during the project operating (10 years). The main viability indicators used were the Net Present Value (NPV), the Internal Rate of Return (IRR) and the payback. The results showed greater recovery and biomass productivity in bioreactor with higher organic matter (28.61 ± 0.71 g and 0.1144 g biomass L^{-1} day^{-1}). The greater COD reduction was 69.23%. Except for the lipids and proteins, whose concentrations were higher in the biomass produced in the most concentrated substrates, the other components remained the same. Regarding the economic viability, the results showed that, with a productivity of 0.085 g biomass L^{-1} day^{-1} , 9.58 tons of biomass could be produced during one year. The total investment for the project was estimated in R\$ 6,361,456.51, with an annual costs of R\$ 2,366,131.38 and incomes of R\$ 3,870,913.15. Considering these results and the viability indicators of 23.70% for the IRR and R\$ 4,466,192.26 for the NPV, per annum, the project was considered feasible, providing the recovery of the invested capital within 3.98 years of activity.

Keywords: Carotenoids, Economics, Bacteria, Biotechnology, Fishing Industry Effluents, Biomass

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Introdução

A utilização de pigmentos na aquicultura tem conquistado mercados cada vez mais expressivos, aumentando a demanda por produtos capazes de intensificar a coloração dos peixes cultivados para o consumo humano. Entretanto, são reconhecidos pelo setor produtivo problemas associados aos altos custos do ingrediente sintético utilizado na alimentação dos animais, o que tem levado a estudos para a obtenção de produtos pigmentantes de origem natural (vegetal ou microbiana) que possam ser mais baratos e ambientalmente aceitáveis (DEL CAMPO et al., 2007; LORENZ; CYSEWSKI, 2000; TAKAHASHI et al., 2008).

Alguns micro-organismos fotossintetizantes são capazes de utilizar efluentes industriais como substrato para seu crescimento, depurar a matéria orgânica poluente e gerar biomassa rica em pigmentos e aminoácidos essenciais (PONSANO et al., 2011). No entanto, esse processo requer equipamentos complexos para o cultivo e posterior separação da massa celular produzida durante o crescimento microbiano. Como existem poucos dados na literatura sobre estudos de viabilidade econômica para projetos com essa característica, é possível que isso se reflita na situação atual do mercado mundial de pigmentos comerciais, praticamente dominados por produtos de origem sintética. Além disso, poucos são os indícios de grandes empresas que produzem aditivos de característica similar a partir de micro-organismos com reconhecida capacidade de gerar pigmentos (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

Rubrivivax gelatinosus é uma bactéria fototrófica que apresenta resultados satisfatórios no tratamento despoluente de efluentes industriais e na produção de uma biomassa constituída por pigmentos carotenoides e componentes essenciais para a nutrição animal (LIMA et al., 2011a; 2011b; PONSANO et al., 2003; 2008; 2011; PRASERTSAN et al., 1993a; 1993b; 1997;

SASAKI et al., 1981). Essas vantagens permitem considerá-la como um micro-organismo com potencial para uso biotecnológico visando à obtenção de um produto com valor agregado. Porém, ainda são necessários estudos capazes de melhorar a produtividade e de avaliar seu potencial econômico, principalmente, quando o cultivo for objeto de aplicação em larga escala.

Na avaliação econômica de projetos são considerados estudos prospectivos de análise de mercado, fatores relacionados aos ambientes interno e externo ao negócio proposto, *layout* descritivo (etapas condizentes com a obtenção do produto), plano de *marketing*, relação do material de consumo e equipamentos necessários para a condução da atividade. Ainda, para esse tipo de estudo, se define como horizonte de dados o espaço de tempo em que se podem estimar os futuros fluxos de caixa do empreendimento. Geralmente, são considerados períodos de 10 anos (BUARQUE, 1994).

Os indicadores econômicos mais utilizados na avaliação de projetos são: o Valor Presente Líquido (VPL), que corresponde a soma de uma série de fluxos de caixa desde a data zero até a data final do horizonte de dados e a Taxa Interna de Retorno (TIR), responsável por demonstrar a rentabilidade da atividade econômica. Adicionalmente, são calculados o *payback* e o ponto de equilíbrio, importantes para demonstrar flexibilidade do investimento (BATALHA, 2007; BUARQUE, 1994). Dessa forma, o investidor pode encontrar condições favoráveis para avaliar diferentes cenários e escolher aquele que apresenta as melhores vantagens para o início do seu negócio.

2 Revisão de literatura

2.1 Pigmentos carotenoides

Os carotenoides representam o grupo mais amplo de pigmentos naturais conhecidos, capazes de conferir coloração amarela, laranja ou vermelha em muitos alimentos, tais como frutas, hortaliças, gemas de ovos e organismos

aquáticos. Plantas, algas e alguns micro-organismos são os principais responsáveis pela sua síntese e eles podem estar presentes em tecidos de animais, aonde chegam por meio das dietas alimentares (GOODWIN, 1981; MALDONADE et al., 2008).

Dados da literatura revelam a existência de mais de 600 tipos de pigmentos carotenoides isolados e identificados nos reinos animal e vegetal e, a cada ano, esse número aumenta com a descoberta de novos compostos com propriedades pigmentantes. O β -caroteno, por exemplo, foi o primeiro carotenoide a ser sintetizado e comercializado como corante de alimentos e é também, o pigmento mais abundante na natureza (AMBRÓSIO et al., 2006).

Dependendo do grau de substituição que apresentam em sua estrutura, os carotenoides são divididos em dois grupos principais: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos consistem inteiramente de átomos de carbono e hidrogênio, sendo, portanto, hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de insaturação, enquanto que as xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações que envolvem a adição de várias funções oxigenadas, sendo, por isso classificadas como oxicarotenoides (AMBRÓSIO et al., 2006; BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007; SHAHIDI et al., 1998).

O uso dos pigmentos carotenoides como ingrediente na indústria alimentícia, além de conferir cor aos alimentos e uniformizar a coloração de alguns produtos, principalmente após o processamento industrial e o armazenamento, também pode proporcionar atividades biológicas relevantes ao consumidor (TATSCH, 2008). Por exemplo, o β -caroteno apresenta função antioxidante e é precursor da vitamina A. Essa atividade pró-vitáminica representa uma importante ferramenta no combate da hipovitaminose A, uma deficiência nutricional que acarreta xenofthalmia, cegueira e morte prematura em milhares de crianças no mundo e constitui um dos principais problemas nutricionais de populações de países em desenvolvimento (AMBRÓSIO et al., 2006; BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; TATSCH, 2008). Além disso, existe uma inversa relação entre a ingestão de alimentos ricos em

pigmentos carotenoides com a incidência de alguns tipos de cânceres (pulmão, mama, estômago, cólon e próstata), problemas de pele induzidos pela exposição à radiação ultravioleta, doenças cardiovasculares coronarianas, cataratas e degeneração macular (BOTELLA-PAVÍA; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; GOODWIN, 1986; KIM et al., 2001; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2007; SHAHIDI et al., 1998; ZIEGLER, 1989; 1991).

2.2 Pigmentos comerciais

A síntese comercial de carotenoides foi desenvolvida pela primeira vez em 1954, quando o β -caroteno foi sintetizado para fins de pigmentação industrial e, a partir da década de 60, houve um aumento considerável na produção em resposta à crescente demanda pelo produto (RIBEIRO, 2008; VALDUGA et al., 2009). Atualmente, no mercado internacional existem duas grandes empresas de maior expressão: a DSM e a BASF que, juntas, respondem por mais de 55% da comercialização dos carotenoides (COSGROVE, 2010). Outras empresas atuantes no mercado são: Algatechnologies Ltd., Allied Industrial Corporation Ltd., Carotech Bhd, Chr. Hansen A/S, Cognis Group, Cyanotech Corporation, Kemin Industries Inc., LycoRed Ltd., Map Technologies Ltd., Phytone Limited e Valensa International LLC.

Em 2003, o mercado europeu de carotenoides movimentou um total de US\$ 348,5 milhões e era previsto para, em 2010, atingir US\$ 419,6 milhões (VALDUGA et al., 2009). De acordo com Fraser e Bramley (2004), esse produto representa um mercado global estimado em 935 milhões de dólares por ano e, segundo Ribeiro (2008), tem apresentado um crescimento próximo de 3% ao ano. Ainda, de acordo com esses autores, produtos sintéticos dominam praticamente todo o mercado para a alimentação animal, com uma movimentação anual que ultrapassa US\$ 300 milhões somente na Europa.

Em 2007, a projeção feita pela *Global Industry Analysts, Inc.* (COSGROVE, 2010), estimou que, para um período de três anos, o mercado de

carotenoides poderia alcançar valores próximos a 1,06 bilhões de dólares. Em 2010, houve uma movimentação acima do previsto, ou seja, US\$ 1,07 bilhões e a projeção feita para 2015 prevê um aumento significativo para mais de US\$ 1,2 bilhões, demonstrando a importância econômica que representa o comércio internacional desses produtos. Todo esse crescimento é reflexo da demanda por produtos com coloração intensa que são mais atraentes e agregam vantagens e benefícios para a saúde dos consumidores.

A principal aplicação comercial dos carotenoides sintéticos está na alimentação animal, embora resultados promissores já possam ser vistos para a indústria alimentícia e farmacêutica. A astaxantina, por exemplo, é o pigmento de escolha para conferir coloração em organismos aquáticos e é representada comercialmente pelo produto sintético, sendo poucos os registros no mercado internacional desse princípio ativo proveniente de fontes naturais como algas e leveduras (DEL CAMPO et al., 2007; LORENZ; CYSEWSKI, 2000; PASSOS et al., 2007; VALDUGA et al., 2009).

O mais recente levantamento feito pela *Global Industry Analysts, Inc.* (COSGROVE, 2010), revelou que os principais carotenoides de interesse comercial no mundo são o β -caroteno, a cantaxantina, a luteína e a astaxantina. O β -caroteno, conhecido pelos benefícios conferidos à saúde humana e à alta capacidade de conferir cor aos alimentos, é o produto mais representativo do segmento, com uma venda estimada em US\$ 392 milhões por ano. A cantaxantina é o carotenoide de maior crescimento no mercado, sendo considerado o aditivo pigmentante preferido, porém ainda pouco utilizado para conferir avermelhamento na gema de ovos, carapaça de camarões e carne de peixes. Junto com a luteína, um pigmento que apresenta funções biológicas importantes, apresentaram aumento estimado em US\$ 28,8 milhões somente entre 2007 e 2010. A astaxantina é o pigmento carotenoide de maior uso na aquicultura, com uma movimentação anual, segundo projeções feitas em 2007, de US\$ 219,03 milhões no mercado internacional (COSGROVE, 2010; DEL CAMPO et al., 2007).

Os preços de mercado desses produtos podem sofrer variações, dependendo do fabricante e do local de comercialização. Segundo Valduga et al. (2009), o grama de β -caroteno e da astaxantina pode custar R\$ 57,00 e R\$ 633,00, respectivamente. Já o miligrama da zeaxantina tem sido reportada com o valor de R\$ 1.690,00. De acordo com Takahashi et al. (2008), no início de 2008, o preço do produto comercial contendo 8% de princípio ativo astaxantina, usualmente utilizado no cultivo de trutas, era de US\$ 302 o quilograma no Brasil, já adicionado de impostos. Apesar do valor desses produtos ter sofrido significativas quedas nos últimos anos, ainda representa um custo adicional considerável para a aquicultura.

Em uma busca realizada recentemente entre alguns fornecedores desses ingredientes para o uso avícola, os produtos com 10% de princípio ativo cantaxantina da DSM (Carophyll® red 10%) e BASF custavam, respectivamente, R\$ 610,00 e R\$ 565,00 o quilograma. Já o produto comercial contendo 30% de luteína pode ser encontrado por R\$ 420 o quilograma. Suplementos alimentares à base de *Spirulina* também estão disponíveis no mercado e custam R\$ 170,00 o quilograma.

2.3 Pigmentos na aquicultura

A expansão da aquicultura mundial tem estimulado o interesse pela utilização de carotenoides na alimentação de peixes com a finalidade de conferir pigmentação, uma vez que a cor agrega valor para algumas espécies de peixes comerciais e ornamentais, além de manter as características organolépticas do produto e aumentar o seu valor nutricional (ANDERSON, 2000; COLIHUEQUE, 2010; GRASSI, 2014; LU ; TAKEUCHI, 2002; LU et al., 2003; PONCE-PALAFOX et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2008; WANG et al., 2006).

Qualquer substância que possui a capacidade de promover a intensificação da cor nos tecidos ou células de animais ou plantas pode ser denominada de pigmento (COLIHUEQUE, 2010). As diferentes colorações

observadas nos mais variados organismos aquáticos se devem, principalmente, a um grupo especial de células denominadas cromatóforos. Essas células possuem organelas capazes de espalhar ou refletir a luz e sintetizam ou armazenam pigmentos que podem ser divididos em quatro grupos: melanina, carotenoides, pteridinas e purinas. A melanina confere o escurecimento da pele observado na grande maioria dos peixes e, junto com as pteridinas e as purinas, possuem pouca importância para a coloração comercial desses animais. Os carotenoides, entretanto, são os principais responsáveis pelas cores tão populares, observadas nos peixes ornamentais. Além disso, sua utilização em dietas alimentares confere, em alguns casos, o avermelhamento da carne de peixes muito apreciados e valorizados pelos consumidores, tais como o salmão e as trutas (ANDERSON, 2000; COLIHUEQUE, 2010).

Diversos carotenoides estão presentes nos peixes: luteína (amarelo esverdeado), tunaxantina, zeaxantina (amarelo alaranjado), β -caroteno (alaranjado), cantaxantina (alaranjado vermelho) e astaxantina (vermelho), considerada como o pigmento de maior expressão nos peixes, principalmente por conferir a coloração avermelhada em salmonídeos. O pigmento luteína é relativamente comum nas espécies tropicais e pode ser encontrado em alguns organismos aquáticos marinhos. Já a tunaxantina está presente em vários peixes escombrídeos e carangídeos, como o *Yellowtail* (*Seriola quinqueradiata*), um peixe muito apreciado no Japão, no qual o pigmento é o principal responsável pela coloração amarela (GUPTA et al., 2007).

No meio ambiente, os peixes adquirem pigmentos carotenoides pela ingestão de algas, plantas, crustáceos ou de outros peixes dos quais se alimentam. No caso dos salmonídeos, sua carne é originalmente branca mas, quando migram da água doce para o mar e ali residem e crescem, adquirem a coloração vermelha na carne, pois parte da sua alimentação passa a ser constituída por alguns crustáceos, como camarões e caranguejos, que apresentam o pigmento astaxantina. Posteriormente, esse componente é depositado na pele e na musculatura. Em sistemas intensivos de produção de peixes em cativeiro, os carotenoides se fazem presentes nas rações fornecidas

para esses animais, muitas vezes, representados por compostos de origem sintética e que possuem elevado valor comercial (TAKAHASHI et al., 2008).

Administrar pigmentos na alimentação de peixes pode alterar a coloração da carne (ARREDONDO-FIGUEROA et al., 2007; BAKER et al., 2002). Alguns trabalhos mencionam que o pico de deposição dos pigmentos ocorre em três semanas e a coloração dos animais tratados permanece constante e sem alterações significativas, mesmo com o uso contínuo destes ingredientes (CHOUBERT; STOREBAKKEN, 1989; PONCE-PALAFIX et al., 2004). Isto se torna importante para considerar o custo-benefício da utilização destes ingredientes nas rações de peixes criados em cativeiro, já que os pigmentos disponíveis no mercado ainda possuem um custo muito elevado para o sistema produtivo.

Além dos salmonídeos, outras espécies de peixes também foram estudadas com a intenção de avaliar a presença de pigmentos carotenoides. Czeczuga et al. (2005) determinaram os pigmentos presentes em duas espécies de peixes cultivadas na Polônia e observaram um total de 16 diferentes tipos de carotenoides presentes em amostras de tecido de pele, músculo, fígado e intestino. Luteína com astaxantina e astaxantina com zeaxantina foram os componentes mais encontrados na pirapitinga herbívora (*Piaractus brachypomus*) e na piranha vermelha predadora (*Pygocentrus nattereri*), respectivamente. Em outro estudo envolvendo alevinos de peixe-pargo criados em cativeiro, dietas contendo o camarão como fonte de carotenoide foram mantidas durante quatro meses. Em 100% dos animais avaliados ao final dos tratamentos, observou-se significativo aumento da coloração rósea da pele, semelhante ao peixe criado em seu *habitat* natural, e a quantificação de carotenoides na carcaça e nos olhos dos animais pigmentados foi superior aos do grupo controle (CEJAS et al., 2003). A deposição de pigmentos também foi observada no exoesqueleto de camarões branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*) submetidos a uma alimentação contendo carotenoides naturais (zeaxantina e luteína) provenientes de extratos da flor de calêndula (*Tagetes erecta*) durante 14 dias (VERNON CARTER et al., 1996).

Nos peixes ornamentais, a coloração representa um dos principais fatores para a determinação de sua procura e de seu valor comercial. A astaxantina e o β -caroteno já foram utilizados para conferir pigmentação ao tetra-serpae (*Hyphessobrycon callistus*). Esses carotenoides, além de conferirem pigmentação, aumentaram a capacidade antioxidante e a proteção hepática dos peixes avaliados (WANG et al., 2006).

2.4 Fontes naturais de pigmentos carotenoides

A utilização de pigmentos para conferir cor, tanto na indústria alimentícia quanto na nutrição animal, tem se tornado uma ferramenta indispensável para a conquista de mercados nos últimos anos. A cor conferida aos produtos alimentícios garante um melhor aspecto, uma maior aceitação e agrega valor econômico durante a comercialização. Grande parte dos ingredientes pigmentantes utilizados nos sistemas de produção são carotenoides de origem sintética, obtidos por meio de processos químicos que utilizam diferentes solventes orgânicos em sua obtenção e resultam em elevados custos para o setor. Nos últimos anos, observa-se uma tendência mundial pela preferência de fontes naturais de nutrientes na alimentação animal em substituição a esses compostos sintéticos (PASSOS et al., 2007; VALDUGA et al., 2009).

De acordo com Gupta et al. (2007), os produtos naturais contendo carotenoides, muitas vezes, possuem uma mistura de componentes pigmentantes como β -caroteno, zeaxantina, luteína, astaxantina, além de outros em menor expressão. Esses produtos podem ser categorizados em dois grupos principais: os de origem animal, muito ricos em astaxantina como as farinhas de crustáceos, e vegetal, como o milho, a alfalfa, a farinha de pétalas de flores (*Tagetes* sp.) e extratos de pimentas vermelhas (*Capsicum* sp.), ricos em β -caroteno, luteína, zeaxantina, entre outros.

O cultivo de determinadas leveduras e microalgas tem sido alvo de pesquisas objetivando prospectar a sua utilização como ingrediente pigmentante

na alimentação animal devido à presença de pigmentos carotenoides. Dentre esses micro-organismos destacam-se a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* e as microalgas dos gêneros *Chlorella*, *Haematococcus* e *Dunaliella*, produtoras dos carotenoides β -caroteno, astaxantina e luteína (DEL CAMPO et al., 2007; DERNER et al., 2006; LORENZ; CYSEWSKY, 2000; PASSOS et al., 2007; TINOI et al., 2006).

A produção de carotenoides a partir do uso de micro-organismos concorre diretamente com a produção sintética realizada pelas grandes empresas químicas do setor. As plantas e os micro-organismos fotossintetizantes como, por exemplo, algas e cianobactérias (azuis e verdes) representam as fontes mais importantes para a biossíntese desses pigmentos, apesar de que alguns micro-organismos não fotossintetizantes também possam responder por parte dessa produção no meio ambiente, como bactérias, fungos e leveduras (GOODWIN, 1986; TATSCH, 2008). A fotossíntese representa um dos mais importantes processos biológicos e consiste na conversão da energia luminosa em energia química, necessária para a manutenção dos seres vivos. A habilidade de realizar tal processo depende da presença de estruturas especiais denominadas clorofilas, no caso de plantas e algas, e bacterioclorofilas, para algumas bactérias (BROCK et al., 1994).

Dentre o grupo de bactérias fotossintetizantes, as bactérias púrpuras representam um grupo versátil, predominantemente aquático e que são capazes de crescer na ausência de oxigênio. Uma característica comum desses micro-organismos é a presença de bacterioclorofilas localizadas em uma membrana intracitoplasmática originada a partir da membrana do citoplasma. A maioria dos pigmentos produzidos por elas são as bacterioclorofilas *a* ou *b* e vários carotenoides como a espiriloxantina, rodopinal, esferoidene e outros da série okenone, responsáveis por conferir cor característica às colônias e aos meios de cultivos. Além disso, essas bactérias são providas de um aparato flagelar que lhes permite o movimento por fototaxia e/ou quimiotaxia quando apresentam crescimento fotoautotrófico e/ou foto-heterotrófico (BROCK et al., 1994; ERASO; KAPLAN, 2001; HOLT et al., 2000; IMHOFF, 2001; IMHOFF et al., 2001).

2.5 Biomassa pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus*

Rubrivivax gelatinosus é uma bactéria fototrófica púrpura gram-negativa do grupo das não sulfurosas com forma de bacilo levemente encurvado ou reto. O *habitat* natural desse micro-organismo é diversificado, sendo encontrado em ambientes aquáticos, no solo, em valas de esgotos e lodos, além de efluentes industriais (HOLT et al., 2000). Os pigmentos fotossintetizantes presentes nessa bactéria são a bacterioclorofila *a* e os carotenoides da série esferoidene (esferoidene, hidroxiesferoidene e espiriloxantina), responsáveis pela coloração vermelho púrpura observada nos cultivos (AGALIDIS et al., 1999; BROCK et al., 1994; HOLT et al., 2000; PONSANO et al., 2002a). Outra importante característica de *Rubrivivax gelatinosus* é a rica composição proteica de suas células, apresentando uma quantidade balanceada de aminoácidos essenciais, além de carboidratos, lipídeos e cinzas, constituindo a biomassa bacteriana (PONSANO et al., 2003; 2011; SASAKI et al., 1981).

Santo et al. (2013) avaliaram a concentração de oxicarotenoides presentes na biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, obtida em cultivos realizados com efluentes agroindustriais e encontraram 3,74 mg g⁻¹ de carotenoides por grama de biomassa seca, corroborando com estudos anteriores desenvolvidos por Prasertsan et al. (1997) e Ponsano et al. (2011) que relataram valores entre 2,13 a 3,90 mg g⁻¹ de carotenoides por grama de biomassa seca. Embora a concentração de carotenoides presente nas biomassas bacterianas seja inferior ao pigmento sintético comercial com 8% do princípio ativo cantaxantina, estudos realizados com a biomassa utilizada como ingrediente pigmentante para aves e peixes demonstraram resultados promissores (AVANÇO et al. 2014; GRASSI, 2014; POLONIO et al., 2010; PONSANO et al., 2014; PONSANO et al., 2002b; PONSANO et al., 2004a; 2004b).

Utilizada para pigmentação de frangos de corte, a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* induziu um amarelamento das carcaças dos animais. A pele foi o local de maior pigmentação em comparação com a musculatura de peito e coxas. No entanto, os resultados foram menos efetivos do que os obtidos pela utilização

de pigmentos convencionais que, adicionalmente, produziram carne e pele com tonalidade mais avermelhada (PONSANO et al., 2002b; 2004a). Recentemente, Avanço et al. (2014) utilizaram a biomassa produzida em efluentes de entrepostos de pescado para a avaliação da pigmentação de frangos de corte alimentados durante 45 dias com o produto. Foram utilizadas diferentes concentrações da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* e os resultados demonstraram que, com uma proporção de 3 g kg⁻¹, a biomassa induziu a tonalidade vermelha na pele e na carne dos animais abatidos.

Quando utilizada para a alimentação de galinhas poedeiras, a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* intensificou a coloração amarela das gemas de ovos, a partir de 24 horas de administração, em todos os níveis de tratamento utilizados e o *plateau* de pigmentação aconteceu no vigésimo dia de produção (PONSANO et al., 2004b). Polonio et al. (2010) encontraram resultados similares observando a intensificação da cor das gemas de galinhas poedeiras alimentadas com a biomassa produzida em cultivos do micro-organismo em efluentes de abatedouros avícolas. A análise sensorial mostrou que as gemas contendo o pigmento natural alcançaram a preferência dos consumidores locais.

Estudos recentes avaliaram a utilização da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* para conferir pigmentação nos filés de peixes cultivados em sistemas fechados de circulação de água (GRASSI, 2014; PONSANO et al., 2014). Nos trabalhos ficou demonstrado que a biomassa foi capaz de aumentar a pigmentação, a presença de carotenoides e o teor de proteína nos filés dos animais.

Portanto, a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* pode ser aplicada como fonte pigmentante na nutrição animal. Além disso, o metabolismo da bactéria consome grande parte da matéria orgânica do substrato utilizado para seu cultivo e, quando o substrato é representado por efluentes industriais, esse cultivo pode tornar-se altamente vantajoso para as empresas geradoras sob o aspecto ambiental em função da descontaminação promovida nos resíduos (LIMA et al., 2011a; 2011b; PONSANO et al., 2011; PRASERTSAN et al., 1997).

2.6 Viabilidade econômica em processos de obtenção de pigmentos microbianos

Apesar de muitos micro-organismos possuírem a capacidade de produzir carotenoides, nem todos são interessantes para a produção em escala industrial. Vários são os exemplos de estudos relatados na literatura para a obtenção de ingredientes pigmentantes provenientes de fontes naturais diversas, seja animal, vegetal ou microbiana. No entanto, essas pesquisas mostram processos desprovidos de avaliações econômicas e de indicadores financeiros. Consequentemente, o emprego desses carotenoides como ingrediente alimentar para animais zootécnicos ainda é um reflexo de estudos conduzidos por institutos de pesquisa e pelas universidades, fora do alcance da produção industrial.

Para exemplificar essa afirmação, Lorenz e Cysewsky (2000) descreveram o potencial comercial da biomassa obtida do cultivo da microalga *Haematococcus* como fonte de astaxantina para aquicultura, avicultura e mercado de alimentos nutracêuticos. Segundo os autores, a produção é relativamente simples e a microalga cresce em substratos com reduzida concentração de nutrientes específicos. Entretanto, não foram apresentados os cálculos envolvendo todos os custos relativos à produção da biomassa. Adicionalmente, foram relatados alguns problemas para a produção em escala industrial como a possibilidade de contaminação do meio por outros micro-organismos indesejáveis. Nesse contexto, processos para obtenção de carotenoides naturais de origem microbiana necessitam de mais estudos para que a obtenção industrial do produto final e sua aplicação sejam economicamente viáveis.

Quando são realizadas buscas na literatura científica por informações a respeito da viabilidade dos processos de obtenção de biomassas provenientes de cultivos bacterianos para pigmentação animal, o resultado se mostra negativo, ou seja, inexistem informações disponíveis para se prospectar o início de qualquer atividade econômica com esse fim. Por outro lado, apesar de poucos,

existem trabalhos que avaliaram o potencial de microalgas para a produção de pigmentos naturais e biocombustíveis em escala industrial, respaldados por estudos de mercado e análises econômicas (LI et al., 2011; MOLINA GRIMA et al., 2003; OLAIZOLA, 2003; STHEPENS et al., 2010).

A análise de estudos que utilizaram cultivos fotoheterotróficos para tratamento de efluentes e produção de pigmentos carotenoides indica que a aquisição e a instalação de biorreatores representam o mais alto custo de investimento (LI et al., 2011; MOLINA GRIMA et al., 2003; MOSCOSO et al., 2012; STHEPENS et al., 2010). Moscoso et al. (2012), utilizando *Pseudomonas stutzeri* para remediação de efluentes contendo fenantreno (hidrocarboneto policíclico aromático potencialmente tóxico), relataram que os biorreatores necessários para o crescimento da bactéria correspondem a mais de 65% do investimento inicial para a aquisição de equipamentos. Embora nesse estudo não houvesse pretensão de produzir biomassa com caráter pigmentante, as avaliações de viabilidade do projeto foram realizadas com o objetivo de averiguar formas alternativas de tratamento biológico de efluentes industriais potencialmente perigosos.

A quantidade de biorreatores necessários para manter uma produção contínua de biomassa a partir do cultivo de micro-organismos fotossintetizantes exemplifica os altos investimentos destinados para os projetos. Molina Grima et al. (2003), ao identificarem baixa produtividade, descreveram a necessidade de 75 biorreatores tubulares para garantir uma produção anual de 26,2 toneladas de biomassa da microalga marinha *P. triornutum*, rica em ácido graxo eicosapentaenoico.

Em estudos de viabilidade econômica utilizam-se alguns indicadores para se afirmar se o projeto é viável. O Valor Presente Líquido (VPL), a Taxa Interna de Retorno (TIR) e os índices de Rentabilidade (IR) e Lucratividade (IL) são convencionalmente avaliados e fornecem dados importantes para a tomada de decisão e a escolha das melhores opções de investimento quando positivos (BATALHA, 2007; BUARQUE, 1994; NOGUEIRA, 2007). Li et al. (2011) desenvolveram um estudo econômico para o cultivo de *Haematococcus pluvialis*

em larga escala objetivando a recuperação de biomassa para a produção de astaxantina. A partir dos dados apresentados pelos autores, foi possível calcular um IL de 36,91% e um IR de 19,90%, considerando uma receita anual de US\$ 792.000,00 obtida com a produção de 36 toneladas da microalga. Em outra situação, Stephens et al. (2010) analisaram as tecnologias para se produzir biomassa de microalgas com alto valor agregado (β -caroteno) e com potencial bioenergético. As avaliações foram feitas em um horizonte de 30 anos e revelaram uma TIR de 15% para um projeto técnico com produtividade de 20 g de biomassa seca $m^{-2} \text{ dia}^{-1}$, em uma área de 500 ha e a um custo de US\$ 600 kg^{-1} do produto pigmentante.

O crescimento da bactéria *Rubrivivax gelatinosus* tem sido estudado com o objetivo de gerar biomassa com reconhecido potencial pigmentante em efluentes de abatedouros avícolas (PONSANO et al., 2003; 2008; 2011) e entrepostos de pescado (LIMA et al., 2011a; 2011b; SANTO et al., 2013). Entretanto, nesses trabalhos, ficaram demonstradas baixas produtividades, comuns a processos que utilizam micro-organismos fotossintetizantes (AZAD et al., 2001; PRASERTSAN et al., 1993a; 1993b; SASAKI et al., 1981). Ainda não há evidências de que o processo de obtenção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* seja viável para uma planta de produção em larga escala apesar de que vários fatores podem ser levados em consideração, tais como o potencial despoluente do micro-organismo e a possibilidade de crescimento da bactéria em efluentes industriais *in natura*, ou seja, sem qualquer tipo de suplementação.

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade econômica do processo de obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* para, possivelmente, indicar a sua utilização como ingrediente pigmentante em um sistema de produção comercial. Essas informações foram levantadas a partir de uma produção em escala laboratorial e posterior simulação de uma unidade de produção inserida em uma indústria de beneficiamento de pescado geradora do resíduo.

O projeto originou dois artigos científicos: “Pré-tratamento de efluente agroindustrial para o aumento da produção de massa celular de *Rubrivivax*

gelatinosus” e “Viabilidade Econômica do Processo de Obtenção de Biomassa Pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus*”.

As normas para envio de artigo científico à revista *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, originado desta tese de doutorado, estão apresentadas na seção APÊNDICE 1.

Referências

AGALIDIS, I.; MATTIOLI, T.; REISS-HUSSON, F. Spirilloxanthin is released by detergent from *Rubrivivax gelatinosus* reaction center as an aggregate with unusual spectral properties. **Photosynthesis Research**, v. 62, p. 31-42, 1999.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243, 2006.

ANDERSON, S. Salmon color and the consumer. **IIFET 2000 Proceedings**, p. 01-03, 2000.

ARREDONDO-FIGUEROA, J. L.; MORA G. I.; PONCE-PALAFIX, J. T.; BARRIGA-SOSA I. A.; VERNON-CARTER E. J. Color of raw, frozen, and smoked fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with astaxanthin and saponified red chili (*Capsicum annum*) extracts. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 16, p. 35-50, 2007.

AVANÇO, S. V.; PONSANO, E. H. G.; GARCIA-NETO, M.; PINTO, M. F. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na criação de frangos de corte: desempenho animal e cor dos produtos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1831-1838, 2014.

AZAD, S. A.; VIKINESWARY, S.; RAMACHANDRAN, K. B.; CHONG, V. C. Growth and production of biomass of *Rhodovulum sulfidophilum* in sardine processing wastewater. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 264-268, 2001.

BAKER, R. T. M.; PFEIFFER, A. M.; SCHÖNER, F. J.; SMITH-LEMMONB, L. Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 99, p. 97-106, 2002.

BATALHA, M. O. **Gestão agroindustrial: GEPAI Grupo de estudos e pesquisas agroindustriais**. 4^a ed., São Paulo: Atlas, 2007.

BOTELLA-PAVÍA, P.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiology Plantarum**, v. 126, p. 369-381, 2006.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINGO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7th ed., New York: Prentice Hall, 1994.

BUARQUE, C. **Avaliação econômica de projetos: uma apresentação didática**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1994.

CEJAS, J. R.; ALMANSA, E.; TEJERA, N.; JEREZ, S.; BOLANOS, A.; LORENZO, A. Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. **Aquaculture**, v. 218, p. 457-469, 2003.

CHOUBERT, G.; STOREBAKKEN, T. Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. **Aquaculture**, v. 81, p. 69-77, 1989.

COSGROVE, J. **The carotenoid market: beyond beta-carotene**. 2010. Disponível em: <http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/view_online-exclusives/2010-12-13/the-carotenoid-market-beyond-beta-carotene> Acesso em: 10 fev. 2015.

COLIHUEQUE, N. Genetics of salmonid skin pigmentation: clues and prospects for improving the external appearance of farmed salmonids. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 20, p. 71-86, 2010.

CZECZUGA, B.; CZECZUGA-SEMENIUK, E.; KLYSZEJKO, B.; SZUMIEC, J. Carotenoid content in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in Poland. **Acta Scientiarum Polonorum**, v. 4, p. 25-32, 2005.

DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 163–1174, 2007.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.

ERASO, J. M.; KAPLAN, S. **Photoautotrophy**. Encyclopedia of Life Sciences, 2001. Disponível em: <<http://www.nrw.intercience.wiley>>. Acesso em: 10 fev. 2012.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228-265, 2004.

GRASSI, T. L. M. **Qualidade de filés de tilápias alimentadas com pigmentante de origem bacteriana**. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2014.

GOODWIN, T. W. The biochemistry of the carotenoids. **Biosynthesis**, v. 1, p. 578-602, 1981.

GUPTA, S. K.; JHA A. K.; PAL, A. K.; VENKATESHWARLU, G. Use of natural carotenoids for pigmentations in fishes. **Natural Product Radiance**, v. 6, p. 46-49, 2007.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

IMHOFF, J. P., The anoxygenic phototrophic purple bacteria. In: GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., v. 1, New York: Springer, 2001.

IMHOFF, J. P.; HIRAISHI, A.; SÜLING, J. Anoxygenic phototrophic purple bacteria. In: GARRITY, G. M. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., v. 2, New York: Springer, 2001.

KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum a-tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 797-809, 2001.

LI, J.; ZHU, D.; NIU, J.; SONGDONG, S.; WANG, G. An economic assessment of astaxanthin production by large-scale cultivation of *Hametococcus pluvialis*. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 568-574, 2011.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. Cultivation of *Rubrivivax gelatinosus* in fish industry effluent for depollution and biomass production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2553-2558, 2011a.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. Recuperação de biomassa bacteriana produzida no tratamento de efluente industrial. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, p. 456-462, 2011b.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 160-167, 2000.

LU, J.; TAKEUCHI, T. Taste of tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw *Spirulina*. **Fishery Science**, v. 68, p. 987-988, 2002.

LU, J.; TAKEUCHI, T.; OGAWA, H. Flesh quality of tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw *Spirulina*. **Fishery Science**, v. 69, p. 529-534, 2003.

MALDONADE, R. I.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**, v. 107, p. 145-150, 2008.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, p.109-117, 2007.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E.; ACIÉN FERNANDEZ, F. G.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

MOSCOSO, F.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Technoeconomic assessment of phenanthrene degradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930 in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 81-89, 2012.

NOGUEIRA, M. P. **Gestão de custos e avaliação de resultados: agricultura e pecuária**. 2ª ed., Bebedouro: Scot Consultoria, 2007.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

PASSOS, R.; MORIEL, D. G.; LAGREZE, F.; GOUVEIA, L.; MARASHIN, M.; BEIRÃO, L. H. Fontes naturais de carotenoides de interesse para a aquicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 2, p. 103-113, 2007.

POLONIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M. Utilization of bacterial (*Rubrivivax gelatinosus*) biomass for egg yolk pigmentation. **Animal Production Science**, v. 50, p. 01-05, 2010.

PONCE-PALAFOX, J. T.; ARREDONDO FIGUEROA, J. L.; VERNON CARTER, E. J. Pigmentación de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) con carotenoides de flor de Cempasuchil (*Tagetes erecta*) en comparación con la astaxantina. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 3, p. 219-225, 2004.

PONSANO, E. H. G.; GRASSI, T. L. M.; SANTO, E. F. E.; MARCOS, M. T. S.; CAVAZZANA, J. F.; PINTO, M. F. Color and carotenoids in tilapia fish feed different carotenoids. In: 60th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY (ICoMST), 2014, Punta Del Este. **Anais eletrônicos** ... Punta Del Este: ICoMST, 2014.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 143-147, 2003.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 445-449, 2002a.

PONSANO, E. H. G.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C. From a pollutant byproduct to a feed ingredient. In: MANTOVIC, D. (Ed.) **Biomass - detection, production and usage**. Croatia: InTech, 2011. p. 461-472.

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

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P. M. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 77-82, 2002b.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M.; LACAVA, P. M. Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 237-242, 2004a.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M.; LACAVA, P. M. *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for egg yolk pigmentation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 13, p. 421-425, 2004b.

PRASERTSAN, P.; CHORIT, W.; SUWANNO, S. Isolation, Identification and growth condition of photosynthetic bacteria found in seafood processing wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 590-593, 1993a.

PRASERTSAN, P.; CHORIT, W.; SUWANNO, S. Optimization for growth of *Rhodocyclus gelatinosus* in seafood processing effluents. **World Journal of**

Microbiology and Biotechnology, v. 9, p. 593-596, 1993b.

PRASERTSAN, P.; JATURAPORNIPIPAT, M.; SIRIPATANA, C. Utilization and treatment of tune condensate by photosynthetic bacteria. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 2439-2445, 1997.

RIBEIRO, B. D. **Aplicação de tecnologia enzimática na obtenção de β -caroteno a partir de óleo de buriti (*Mauritia vinifera*)**. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

SANTO, E. F. E.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 47-51, 2013.

SASAKI, K.; NOPARATNARAPORN, N.; HAYASHI, M.; NISHIZAWA, Y.; NAGAI, S. Single-Cell protein production by treatment of soybean wastes with *Rhodopseudomonas gelatinosa*. **Journal of Fermentation and Technology**, v. 59, p. 471-477, 1981.

SHAHIDI, F.; METUSALACH; BROWN, J. A. Carotenoid pigments in seafood and aquaculture. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, p. 01-67, 1998.

STEPHENS, E.; ROSS, I.; KING, Z.; MUSSGUG, J.; KRUSE, O.; POSTEN, C. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 126-128, 2010.

TAKAHASHI, N.S.; TSUKAMOTO, R.Y.; TABAT, Y.A.; RIGOLINO, M.G. Truta salmonada: processo produtivo em constante aprimoramento no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 105, p. 28-33, 2008.

TATSCH, P. O. **Produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. 2008. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2008.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophylomyces dendrorhous*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 309-314, 2006.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

VERNON CARTER, E.; PONCE PALAFOX, J.; PEDROZA ISLAS, R. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) using aztec marigold (*Tagetes erecta*) extracts as the carotenoid source. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 46, p. 243-246, 1996.

WANG, Y.; CHIEN, Y.; PAN, C. Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. **Aquaculture**, v. 261, p. 641-648, 2006.

ZIEGLER, R. G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 116-122, 1989.

ZIEGLER, R. G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 251-259, 1991.

CAPÍTULO 2 – PRÉ-TRATAMENTO DE EFLUENTE AGROINDUSTRIAL PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MASSA CELULAR DE *Rubrivivax gelatinosus*

Resumo

Rubrivivax gelatinosus, uma bactéria fotossintetizante com reconhecido potencial biotecnológico, foi cultivada em efluente colhido de um entreposto de processamento de tilápias para a realização de estudos sobre a produção de massa celular, produtividade, Demanda Química de Oxigênio (DQO) e composição centesimal. Inicialmente, diferentes condições de cultivo foram pré-estabelecidas com o objetivo de aumentar a produtividade e a recuperação da biomassa. A microfiltração foi utilizada para concentrar a matéria orgânica do efluente *in natura* em três níveis ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ do volume inicial). Após a concentração, os efluentes foram tratados termicamente a 65°C por 30 minutos e resfriados até 25°C. Os cultivos foram realizados em biorreatores anaeróbicos (50 L) contendo o inóculo da bactéria (1% v v⁻¹), à temperatura de 32 ± 2°C e iluminados (1.500 ± 200 lux) durante cinco dias. A biomassa foi recuperada por microfiltração e desidratada por liofilização. As amostras de biomassa obtidas foram analisadas para determinação da composição centesimal. Os resultados indicaram maior recuperação (28,61 ± 0,71 g) e produtividade (0,1144 g biomassa L⁻¹ dia⁻¹) no cultivo que detinha a maior quantidade de matéria orgânica. A maior redução de DQO foi de 69,23%. A composição centesimal dos produtos pigmentantes revelou semelhanças entre os tratamentos, à exceção dos teores de lipídeos e proteínas, que foram maiores no cultivo com maior disponibilidade de matéria orgânica.

Palavras chave

Bactéria fotossintetizante; Biomassa, Biotecnologia, Indústria, Pescado, Resíduo.

Abstract

Rubrivivax gelatinosus, a phototrophic bacterium with recognized biotechnological potential, was cultivated in the effluent of a tilapia processing industry for the evaluation of biomass production, productivity, Chemical Oxygen Demand (COD) and proximate composition. Initially, different concentrations of the substrate were performed with the purpose of increasing the productivity and the biomass recovery. Microfiltration was used to modify the organic composition present in the wastewater in three levels of concentration ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ and $\frac{3}{4}$ the initial volume). After the concentration, the effluent was heated at 65°C for 30 minutes. Bacterial cultivation was carried out in bioreactors under anaerobiosis with an inoculum level of 1%, 1.500 ± 200 lux and 32 ± 2°C, during five days. The biomass was recovered by microfiltration and freeze-dried. Samples of biomass were analyzed to evaluate the proximate composition. The results showed greater recovery and biomass productivity in the bioreactor with the highest organic matter (28.61 ± 0.71 g and 0.1144 g biomass L⁻¹ day⁻¹), respectively. The greater COD reduction was 69.23%. The chemical composition of the biomass differed for lipids and proteins, which were higher for the treatments with higher concentration of substrate for the growth of the microorganism.

Keywords

Fish, Biomass, Biotechnology, Industry, Phototropic bacteria, Wastewater.

Introdução

Bactérias fototróficas são amplamente utilizadas para o tratamento de efluentes, produção de biomassa e obtenção de pigmentos carotenoides (KANTACHOTE et al., 2005; LIMA et al., 2011a; 2011b; LU et al., 2010; PONSANO et al., 2008; MADUKASI et al., 2010; WU et al., 2014; 2015; ZHOU

et al., 2014; 2015). Bacterioclorofilas luz-dependentes localizadas na membrana intracitoplasmática desses organismos permitem a transferência de energia necessária para a manutenção de suas estruturas celulares. Consequentemente, cultivos desenvolvidos em efluentes agroindustriais são acompanhados da geração de massa celular com propriedades pigmentantes. Além das bacterioclorofilas *a* ou *b*, alguns carotenoides como espiriloxantina, rodopinal, esferoidene e outros da série okenone, são responsáveis por conferir cor às colônias e aos cultivos microbianos (BROCK et al., 1994; HOLT et al., 2000; IMHOFF; TRÜPER, 1989).

Efluentes com alta concentração de matéria orgânica e minerais possibilitam o crescimento de bactérias fototróficas (SIRIANUNTAPIBOON; SRIKU, 2006). Lu et al. (2010; 2011) demonstraram a capacidade desses micro-organismos degradarem macromoléculas presentes em cultivos ricos em polissacarídeos e proteínas. Essa característica também foi encontrada por Lima et al. (2011a) ao reportarem uma redução de 47,71% para óleos e graxas e 22,46% para nitrogênio total no cultivo de *Rubrivivax gelatinosus* em efluente de uma indústria de processamento de pescado.

A baixa disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento microbiano em águas residuárias limita a produção de massa celular. Consequentemente, a suplementação desses efluentes tem sido estudada para se aumentar a produtividade e a geração de massa celular (MADUKASI et al., 2010; SCHNEIDER et al., 2006; WU et al., 2012; 2015).

Tecnologias alternativas, como a microfiltração, já são realidade para o tratamento de efluentes domésticos e industriais (JUDD; JEFFERSON, 2003). O sistema origina, por meio de uma força motriz aplicada para a passagem do efluente pela membrana tubular, duas linhas distintas denominadas de concentrado e permeado (AL-MALACK; ANDERSON 1997; TCHOBANOGLIOUS et al., 2003). No concentrado, os sólidos com dimensões superiores à porosidade da membrana são acumulados e podem se tornar disponíveis para o metabolismo dos micro-organismos fototróficos, aumentando a eficiência da produção de biomassa.

Rubrivivax gelatinosus é uma bactéria fototrófica encontrada em resíduos líquidos industriais (IMHOFF, 2001). Seu crescimento fotoheterotrófico é acompanhado pela produção de biomassa com reconhecido potencial pigmentante (PONSANO et al., 2011). Entretanto, baixas produtividades foram encontradas em seu cultivo em efluentes industriais com reduzida quantidade de matéria orgânica (PONSANO et al., 2003; 2008; LIMA et al., 2011b; SANTO et al., 2013). Portanto, objetivou-se nesse estudo, utilizar um sistema de microfiltração para concentrar a quantidade de matéria orgânica no efluente *in natura* em diferentes níveis, cultivar a bactéria *Rubrivivax gelatinosus* e avaliar a recuperação de biomassa, a produtividade do processo e a composição centesimal dos produtos pigmentantes.

Material e Métodos

Micro-organismo, preparo do inóculo e substrato para o cultivo

Rubrivivax gelatinosus foi previamente isolada de efluente de abatedouro avícola, caracterizada com base em testes bioquímicos, morfológicos e pelo espectro de absorção de pigmentos fotossintetizantes e mantida a -20°C em meio de *Pfennig* semissólido (cultura estoque) até o momento da reativação (PONSANO et al., 2002).

O preparo do inóculo foi desenvolvido em duas fases, conforme descrito por Lima et al. (2011a). Inicialmente, uma alçada da cultura estoque da bactéria foi transferida para tubos contendo meio de *Pfennig* líquido acrescido de 0,1% ($v v^{-1}$) da solução de microelementos. Em seguida, esse cultivo de pré-enriquecimento foi incubado em condições de anaerobiose, temperatura de $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade de 1.400 ± 200 lux. Após o crescimento do micro-organismo nos tubos, o conteúdo de cada frasco foi transferido ($1\% v v^{-1}$) para provetas de vidro com o mesmo meio sintético. As mesmas condições de incubação foram mantidas e o inóculo foi considerado pronto para uso ao atingir densidade ótica

de 0,5 a 600 nm, avaliado em espectrofotômetro (HITACHI U-1000/U-1100). Foi utilizado como branco o meio de *Pfennig* líquido sem o inóculo da bactéria.

O efluente utilizado como substrato para o crescimento da bactéria foi obtido de uma indústria de abate e beneficiamento de tilápias durante o processamento industrial. Todo o resíduo foi colhido após o tratamento preliminar e transportado imediatamente até o laboratório em bombonas plásticas de 50 L cada.

Cultivos experimentais

Os cultivos foram realizados em quatro tratamentos contendo: (A) efluente *in natura*, isto é, sem ser submetido à concentração de volume pela microfiltração; (B) efluente concentrado pela remoção do permeado da microfiltração na proporção de $\frac{1}{4}$ do volume inicial (25%); (C) efluente concentrado pela remoção do permeado da microfiltração na proporção de $\frac{1}{2}$ do volume inicial (50%) e (D) efluente concentrado pela remoção do permeado da microfiltração na proporção de $\frac{3}{4}$ do volume inicial (75%). Para obter essa concentração, foi utilizado um sistema de microfiltração com unidade de filtração de 0,75 m², porosidade 0,2 µm, vazão 1,5 m³ h⁻¹ e pressão 1,5 bar (FRINGS).

O efluente dos tratamentos A, B, C e D foram aquecidos em tanque de aço inox (INCOMAR) a 65 °C por 30 min, resfriados até a temperatura de 25 °C e distribuídos em biorreatores de vidro de capacidade de 50 L e dimensões 0,50 m x 0,20 m x 0,50 m (comprimento x largura x altura) para a adição do inóculo bacteriano na proporção de 1 % (v v⁻¹). Os biorreatores foram preenchidos totalmente com os substratos e fechados com tampas de vidro para simular um ambiente anaeróbio. Os cultivos foram realizados sobre uma bancada, recebendo iluminação ininterrupta (1.500 ± 200 lux) de lâmpadas incandescentes (60 W) durante cinco dias. Foram realizadas três repetições dos cultivos experimentais.

Análises físico-químicas do efluente

Os efluentes utilizados em todos os tratamentos foram caracterizados quanto aos teores de sólidos totais, nitrogênio total e óleos e graxas, de acordo com os procedimentos descritos em APHA, AWWA e WPCF (2005). A Demanda Química de Oxigênio (DQO) nos efluentes e nos permeados da microfiltração foi determinada segundo metodologia adaptada de Jirka e Carter (1975), que inclui a digestão química da amostra em reator de DQO (Hach DRB200), seguida da leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro (Hach DR2800).

Determinação de rendimento, produtividade e composição centesimal

Após o crescimento da bactéria, todo o conteúdo dos bioreatores foi submetido à microfiltração nas mesmas condições descritas anteriormente. O concentrado foi congelado (-42 °C), liofilizado por 48 horas (LIOBRÁS L101), triturado manualmente em almofariz e pesado para o cálculo da quantidade de biomassa recuperada.

O rendimento (Eq. 1) foi calculado utilizando a relação entre a quantidade de biomassa produzida no sistema e a eficiência do micro-organismo na redução da DQO (TCHOBANOGLIOUS et al., 2003).

$$\text{(Eq. 1) } R = \frac{B}{DQO}, \text{ onde:}$$

R = rendimento (mg biomassa mg^{-1} DQO $^{-1}$);

B = biomassa recuperada no sistema (mg);

DQO = demanda química de oxigênio (mg L^{-1});

A produtividade foi obtida pela equação (Eq. 2), segundo Aiba (1982):

$$\text{(Eq. 2) } P = \frac{B}{V \times t}, \text{ onde:}$$

P = produtividade (g biomassa Litros⁻¹ dia⁻¹);

B = biomassa recuperada no sistema (g);

V = volume do substrato utilizado no cultivo (L);

t = tempo de cultivo (dia).

Posteriormente, as biomassas provenientes de cada tratamento foram armazenadas a vácuo e ao abrigo da luz até o momento da determinação da composição bromatológica (umidade, matéria mineral, proteína bruta e lipídeos totais) de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1999).

Análises estatísticas

Os resultados de composição centesimal, recuperação de biomassa e redução da DQO foram submetidos à análise de variância com teste de *Kruskal-Wallis* para amostras não paramétricas, considerando o nível de significância de 5% (VIEIRA, 1999). O software utilizado foi *GraphPad InStat 3.06 for Windows*, *GraphPad Software, San Diego, California, USA*.

Resultados e discussão

A concentração da matéria orgânica no efluente de cultivo promoveu alterações significativas nos parâmetros físico-químicos apenas entre os tratamentos A e D (Tabela 1).

O efluente do entreposto de processamento de tilápias utilizado para o crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* gerou valores que indicaram pouca quantidade de matéria orgânica. Prasertsan et al. (1993b) realizaram a caracterização físico-química de efluentes provenientes de indústrias de conservas de peixes e obtiveram valores de nitrogênio total (7.616 mg L⁻¹), óleos e graxas (32.182 mg L⁻¹) e sólidos totais (82,2 g L⁻¹) superiores aos apresentados

na Tabela 1. Em outro trabalho, Azad et al. (2003), analisando o efluente da industrialização de sardinhas para cultivos microbianos, encontraram uma DQO de 32.000 mg L⁻¹, ou seja, aproximadamente, trinta vezes maior que o valor encontrado nesse estudo (1.144 mg L⁻¹).

Tabela 1 – Características físico-químicas dos efluentes utilizados para o cultivo de *Rubrivivax gelatinosus* e percentual de redução da demanda química de oxigênio (DQO) após os tratamentos com o sistema de microfiltração

Parâmetros físico-químicos ^{1,2}	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C	Tratamento D	p
ST	1,19 ± 0,04 ^b	1,23 ± 0,1 ^{ab}	1,67 ± 0,1 ^{ab}	3,16 ± 0,1 ^a	0,0213
NT	161 ± 40,1 ^b	197,37 ± 22,7 ^{ab}	227,85 ± 11 ^{ab}	245,95 ± 20,1 ^a	0,0023
OG	775,92 ± 2,5 ^b	845,33 ± 0,5 ^{ab}	872,38 ± 21,1 ^{ab}	1.256 ± 22,8 ^a	<0,0001
DQOi	1.144 ± 17,9 ^b	1.296 ± 25,1 ^{ab}	1.440 ± 22,2 ^{ab}	1.600 ± 22,1 ^a	<0,0001
DQO%	69,23 ± 0,7 ^a	57,50 ± 0,9 ^b	61,88 ± 0,4 ^{ab}	59,16 ± 0,6 ^{ab}	<0,0001

ST: sólidos totais (g L⁻¹); NT: nitrogênio total (mg L⁻¹); OG: óleos e graxas (mg L⁻¹); DQOi: DQO inicial (mg L⁻¹); DQO%: redução da DQO no processo (%). ¹Médias seguidas de mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis. ²Médias e desvios padrões de três repetições.

De acordo com Chowdhury et al. (2010), a quantidade de matéria orgânica presente no resíduo líquido descartado é influenciada diretamente pelo tipo de processamento realizado pela indústria e pode ser dividida em três categorias: baixa (efluentes das operações de limpeza), média (efluentes da filetagem de peixes magros) e alta (efluentes contendo sangue drenado dos tanques de abate ou do cozimento de peixes gordurosos). Nesse estudo, o efluente da filetagem das tilápias foi colhido após o tratamento preliminar da indústria (gradeamento), sendo, portanto, removidas as vísceras, as peles, as escamas e as cabeças com o espinhaço. Isso pode ter contribuído para os baixos valores encontrados na caracterização da matéria prima *in natura*. Por outro lado, a utilização da membrana de filtração permitiu aumentar o teor dessa matéria orgânica no substrato para o cultivo de *Rubrivivax gelatinosus*.

Em todos os tratamentos foi verificada a diminuição da DQO. Entretanto, apenas entre os tratamentos A e B diferiram entre si pelo teste estatístico (Tabela 1). De acordo com os resultados, a microfiltração não apresentou vantagens para a remediação do efluente, pois a diminuição da DQO foi maior no tratamento que utilizou o resíduo na sua forma natural. Azad et al. (2003), alcançaram 83% de redução de DQO utilizando *Rhodovulum sulfidophilum*. No entanto, os autores trabalharam com um inóculo dez vezes maior para conseguir tal efeito. Isso representaria um custo adicional para o processo, considerando uma utilização em escala industrial. Por outro lado, Lima et al. (2011a) obtiveram uma redução menor da DQO (52%) em cultivos realizados com o mesmo micro-organismo sem utilizar a microfiltração do resíduo *in natura*.

O crescimento da bactéria foi detectado visualmente após 48 horas de cultivo, pela alteração da cor do efluente nos biorreatores. Após o quarto dia, o substrato mostrou coloração vermelha intensa e verificou-se a sedimentação de uma pequena quantidade de massa celular em todos os tratamentos. A recuperação e a produtividade aumentaram com o aumento da concentração de matéria orgânica no efluente. Para os tratamentos D, C, B e A, os valores de produtividade foram de 0,1144, 0,1054, 0,0992 e 0,0875 g biomassa L⁻¹ dia⁻¹ e as quantidades recuperadas de biomassa foram de 28,61 ± 0,71 g, 26,34 ± 0,43 g, 24,80 ± 0,09 g e 21,87 ± 0,08 g, respectivamente. Esses dados estão representados na Figura 1.

A degradação de macromoléculas e a consequente redução de poluentes em cultivos de bactérias fototróficas, segundo Lu et al. (2011), são maiores em aerobiose, diferentemente das condições utilizadas neste experimento. De acordo com os autores, a via metabólica utilizada pelos micro-organismos é a fosforilação oxidativa, responsável por mineralizar com maior eficiência a matéria orgânica do substrato. Além disso, cultivos desenvolvidos na ausência de luz induzem bactérias a consumirem mais o carbono orgânico do meio para a produção de energia, o que reduz a sua carga poluente. Por outro lado, a utilização de uma fonte de luz em cultivos bacterianos condiciona os micro-organismos a produzirem pigmentos carotenoides, conforme destacado por

Zhou et al. (2014; 2015). A via metabólica, nesse caso, passa a ser a fotofosforilação que, em condições anaeróbias, favorece o crescimento microbiano e a produção de massa celular (LU et al., 2011). Essa característica foi verificada neste trabalho pelos resultados de DQO, produtividade e recuperação de biomassa obtidos com o cultivo de *Rubrivivax gelatinosus*.

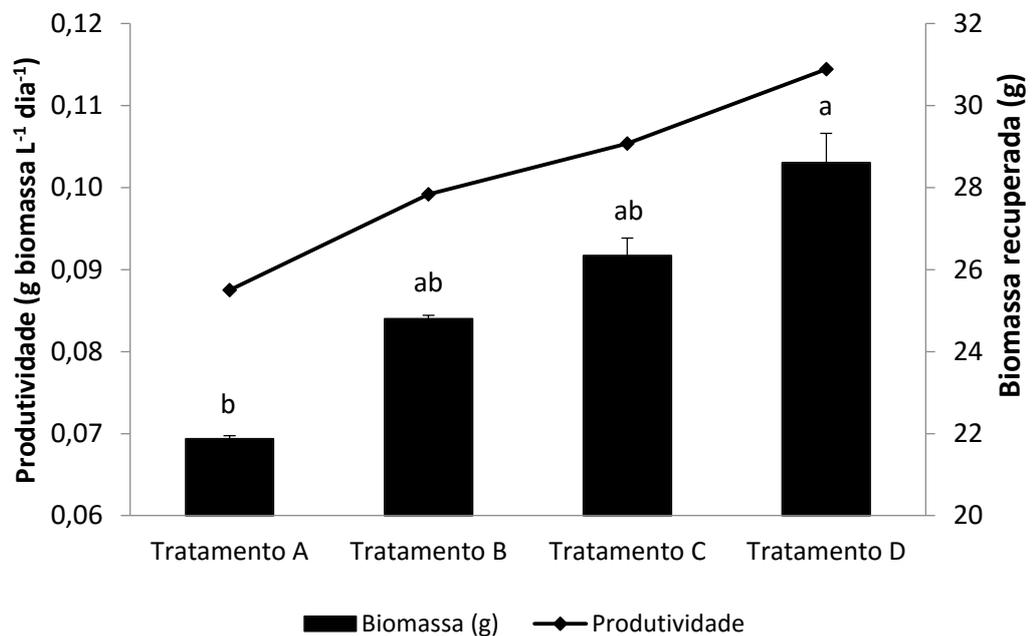


FIGURA 1 – Produtividade e recuperação de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* cultivada em efluente industrial de processamento de tilápias.

O pré-tratamento do efluente industrial possibilitou maior produtividade e recuperação de massa celular. Pesquisadores, em estudos anteriores, reportaram resultados inferiores ao cultivarem o mesmo micro-organismo em substratos contendo apenas o efluente *in natura* sem qualquer tipo de tratamento prévio para aumentar a concentração de matéria orgânica. As produtividades foram de 0,072 (PONSANO et al., 2003), 0,085 (PONSANO et al., 2008) e 0,079 (LIMA et al., 2011b) g biomassa L⁻¹ dia⁻¹. Suplementar os meios de cultivo pode representar uma alternativa para aumentar a recuperação de biomassas de

Rubrivivax gelatinosus como, recentemente, relatado por Wu et al. (2012; 2014), que conseguiram aumentar em 63% e 59% a recuperação de massa celular adicionando 20 mg L⁻¹ de Fe⁺² e 10 mg L⁻¹ de Mg⁺² no substrato de crescimento da bactéria, respectivamente. Entretanto, adicionar nutrientes nesses efluentes pode representar custos adicionais que podem inviabilizar todo o processo desenvolvido em escala industrial.

Com relação aos rendimentos, o maior resultado (0,6654 mg biomassa mg⁻¹ DQO⁻¹) foi encontrado no tratamento B, seguido dos tratamentos D (0,60 mg biomassa mg⁻¹ DQO⁻¹), C (0,59 mg biomassa mg⁻¹ DQO⁻¹) e A (0,55 mg biomassa mg⁻¹ DQO⁻¹). Cultivos realizados com *Rhodopseudomonas sphaeroides* em substratos orgânicos apresentaram rendimentos entre 0,41 e 0,47 mg biomassa mg⁻¹ DQO⁻¹ (LU et al., 2011). Situação semelhante também foi apontada por Wu et al. (2012), ao relatarem rendimentos entre 0,40 e 0,51 mg biomassa mg⁻¹ DQO⁻¹ em substratos cultivados com bactérias fotossintetizantes e suplementados com Fe²⁺. Esses resultados foram inferiores aos obtidos neste experimento. Sistemas tradicionais de tratamento de águas residuárias por lodos ativados apresentam rendimento entre 0,03 e 0,40 mg biomassa mg⁻¹ DQO⁻¹, segundo Grady et al. (1999). Isso reforça o potencial biotecnológico de *Rubrivivax gelatinosus*, que foi capaz de degradar compostos orgânicos de efluentes agroindustriais e gerar massa celular durante o processo realizado sem a necessidade de suplementação dos substratos.

Em relação à composição centesimal, os teores de proteína total e lipídeos totais da biomassa variaram em função do pré-tratamento realizado nos substratos de cultivo. Por outro lado, as concentrações de umidade e matéria mineral não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2). Esses dados demonstraram que, quanto maior a quantidade de matéria orgânica disponível para o desenvolvimento de *Rubrivivax gelatinosus*, maior é o valor nutricional da biomassa. Não foram encontrados valores de referência na literatura para a comprovação dessa evidência, no entanto, algumas semelhanças foram observadas com os resultados apresentados por Santo et al. (2013). Nesse caso, os autores também trabalharam com efluente de uma

indústria de processamento de pescado e utilizaram a liofilização para desidratar o produto que resultou numa biomassa com 4,15% de umidade, 55,41% de proteína bruta, 11,72% de lipídeos totais e 4,33% de cinzas. Portanto, todos os produtos gerados do crescimento de *Rubrivivax gelatinosus* apresentam potencial de aplicação como fonte de suplementação em rações para a alimentação animal.

Tabela 2 – Características da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* produzida nos diferentes tratamentos

Composição centesimal ^{1,2}	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C	Tratamento D	p
UM	4,7 ± 0,3 ^a	4,7 ± 0,2 ^a	5,0 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,5 ^a	0,3688
PT	46,5 ± 1,7 ^b	48,2 ± 1,5 ^b	53,3 ± 0,8 ^a	53,3 ± 1,3 ^a	0,0064
LT	7,1 ± 0,2 ^b	7,5 ± 0,2 ^{ab}	9,9 ± 0,7 ^{ab}	10,9 ± 0,8 ^a	0,0003
MM	4,4 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,3 ^a	3,9 ± 0,1 ^a	4,1 ± 0,5 ^a	0,0950

UM: umidade (g 100g⁻¹); PT: proteína total (g 100g⁻¹); LT: lipídeos totais (g 100g⁻¹); MM: matéria mineral (g 100g⁻¹). ¹Médias seguidas de mesma letra em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis. ²Médias e desvios padrões de três repetições.

Conclusão

A microfiltração utilizada para concentrar a matéria orgânica do efluente de processamento de pescado afetou positivamente a recuperação da massa celular e a produtividade do processo de obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*. Os maiores valores foram obtidos no substrato concentrado pela remoção do permeado na proporção de ¾ em relação ao volume inicial. O pré-tratamento não influenciou a redução da DQO, que foi maior no cultivo realizado com o efluente *in natura*. Os teores de proteína total e lipídeos totais foram maiores na biomassa recuperada dos cultivos mais concentrados.

Referências

AIBA, S. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. **Advances in Biochemistry Engineer**, v. 23, p. 85-156, 1982.

AL-MALACK, M. H.; ANDERSON, G. K. Use of crossflow microfiltration in wastewater treatment. **Water Research**, v. 31, p. 3064-3072, 1997.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA, AWWA e WPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st ed., Washington: APHA. 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16th ed., Arlington: AOAC. 1999.

AZAD, S. A.; VIKINESWARY, S.; CHONG, V. C.; RAMACHANDRAN, K. B. *Rhodovulum sulfidophilum* in the treatment and utilization of sardine processing wastewater. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 13-18, 2003.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINGO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7th ed., New York: Prentice Hall, 1994.

CHOWDHURY, P.; VIRARAGHAVAN, T.; SRINIVASAN, A. Biological treatment processes for fish processing wastewater – a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 439-449, 2010.

GRADY JR, C. P.; DAIGGER, G. T.; LIM, H. C. **Biological wastewater treatment**. 2nd ed., New York: Marcel Dekker Inc. 1999.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed., Philadelphia: Lippincott Williams &

Wilkins, 2000.

IMHOFF, J. P. Genus Incertae Sedis XV *Rubrivivax*. In: GARRITY, G.M. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed., New York: Springer, 2001.

IMHOFF, J. F.; TRÜPER, H. G. Purple nonsulfur bacteria. In: STALEY, J. T. (Ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1989.

JIRKA, A. M.; CARTER, M. J. Micro semi-automated analysis of surface and wastewaters for chemical demand oxygen. **Analytical Chemistry**, v. 47, 1975.

JUDD, S.; JEFFERSON, B. **Membranes for industrial wastewater recovery and re-use**. New York: Elsevier Science, 2003.

KANTACHOTE, D.; TORPEE, S.; UMSAKUL, K. The potencial use of anoxygenic phototrophic bacteria for treating latex rubber sheet wastewater. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 314-326, 2005.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. Cultivation of *Rubrivivax gelatinosus* in fish industry effluent for depollution and biomass production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2553-2558, 2011a.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. Recuperação de biomassa bacterina produzida no tratamento de efluente industrial. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, p. 456-462, 2011b.

LU, H.; ZHANG, G.; DAI, X.; HE, C. Photosynthetic bacteria treatment of synthetic soybean wastewater: direct degradation of macromolecules. **Bioresource**

Technology, v. 101, p. 7672-7674, 2010.

LU, H.; ZHANG, G.; WAN, T.; LU, Y. Influences of light and oxygen conditions on photosynthetic bacteria macromolecule degradation: Different metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9503-9508, 2011.

MADUKASI, E. I.; DAI, X.; HE, C.; ZHOU, J. Potentials of phototrophic bacteria in treating pharmaceutical wastewater. **International Journal of Environment Science and Technology**, v. 7, p. 165-174, 2010.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 143-147, 2003.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, p. 445-449. 2002.

PONSANO, E. H. G.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C. From a pollutant byproduct to a feed ingredient. In: MANTOVIC, D. (Ed.). **Biomass – detection, production and usage**. Croatia: InTech. 2011. p. 461-472.

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

PRASERTSAN, P.; CHOORIT, W.; SUWANNO, S. Isolation, Identification and growth condition of photosynthetic bacteria found in seafood processing wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 590-593, 1993a.

PRASERTSAN, P.; CHOORIT, W.; SUWANNO, S. Optimization for growth of *Rhodocyclus gelatinosus* in seafood processing effluents. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 593-596, 1993b.

SANTO, E. F. E.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 47-51, 2013.

SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; MACHIELS, M. A. M.; EDING, E. H.; VERRETH, J. A. J. The potential of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste. **Water Research**, v. 40, p. 2684-2694, 2006.

SIRIANUNTAPIBOON, S.; SRIKU, M. Reducing red color intensity of seafood wastewater in facultative pond. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1612-1617, 2006.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, D. **Wastewater engineering: treatment disposal and reuse**. Metcalf & Eddy. 4th ed., New York: Mc-Graw Hill, 2003.

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

WU, P.; LI J.; WANG, Y.; LIU, X.; DU, C.; TONG, Q.; LI, N. Promoting the growth of *Rubrivivax gelatinosus* in sewage purification by addition of magnesium ions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 66-71, 2014.

WU, P.; LI J.; WANG, Y.; TONG, Q.; LIU, X.; DU, C.; LI, N. Improving the growth of *Rubrivivax gelatinosus* cultivated in sewage environment. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 38, p. 79-84, 2015.

WU, P.; ZHANG, G.; LI, J.; LU, H.; ZHAO, W. Effects of Fe²⁺ concentration on biomass accumulation and energy metabolism in photosynthetic bacteria wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 55-59, 2012.

ZHOU, Q.; ZHANG, P.; ZHANG, G. Biomass and carotenoid production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light intensity. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 330-335, 2014.

ZHOU, Q.; ZHANG, P.; ZHANG, G. Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: Effects of light sources. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 505-509, 2015.

CAPITULO 3 – VIABILIDADE ECONÔMICA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOMASSA PIGMENTANTE DE *Rubrivivax gelatinosus*

Resumo

Rubrivivax gelatinosus é uma bactéria fototrófica com potencial biotecnológico para a produção de massa celular com propriedades nutricionais e pigmentantes. Neste estudo, objetivou-se avaliar a viabilidade econômica de um projeto para a produção de biomassa da bactéria em escala industrial, tendo como substrato as águas residuais geradas no processamento do pescado. Inicialmente, o micro-organismo foi cultivado no efluente para a determinação da recuperação da biomassa e da produtividade do processo em escala laboratorial. Em seguida, foi desenvolvido um estudo para avaliar os recursos necessários para estimar os desembolsos e as receitas previstos para ocorrer ao longo do tempo de funcionamento do empreendimento. Os principais indicadores de viabilidade utilizados foram o Valor Presente Líquido (VPL) e a Taxa Interna de Retorno (TIR). Os resultados demonstraram que, com uma produtividade de 0,0875 g biomassa L⁻¹ dia⁻¹, o total de biomassa produzida durante um ano seria de 9,58 toneladas. O investimento total do projeto seria de R\$ 6.361.456,51 a um custo operacional anual de R\$ 2.366.131,38, gerando uma receita anual de R\$ 3.870.913,15. A TIR de 23,70% ao ano e o VPL de R\$ 4.466.192,26 demonstraram a viabilidade econômica do projeto, com recuperação do capital investido em 3,98 anos de atividade da unidade industrial.

Palavras-chave

Análise econômica, Bactéria fotossintetizante, Biotecnologia, Efluente, Massa celular.

Abstract

Rubrivivax gelatinosus is a phototropic bacterium with a biotechnological potential to produce biomass with pigmenting properties. The objective of this study was to evaluate the economic viability of a project to produce bacterial biomass on an industrial scale, using the wastewater from a fish industry as the growth substrate. Initially, the microorganism was cultivated in the effluent for the determination of the process productivity and the biomass recuperation in a laboratory scale. Thus, an analysis was developed to assess the resources necessary to estimate costs and revenue that might occur during the project operation. The main viability indicators used were the Net Present Value (NPV) and the Internal Rate of Return (IRR). The results showed that, with a productivity of 0.085 g biomass L⁻¹ day⁻¹, 9.58 tons of biomass could be produced during one year. The total investment for the project was estimated in R\$ 6,361,456.51, with annual costs of R\$ 2,366,131.38 and incomes of R\$ 3,870,913.15. The viability indicators of 23,70% for the IRR and R\$ 4,466,192.26 for the NPV, per annum, were considered feasible to the project, providing the recovery of the invested capital within 3.98 years of activity.

Keywords

Biotechnology, Economic analysis, Phototropic bacterium, Single cell, wastewater.

Introdução

A utilização de aditivos pigmentantes aos alimentos representa uma importante estratégia para conquistar novos mercados, principalmente os considerados mais exigentes quanto à qualidade dos produtos. Como resultado,

é possível garantir melhor aspecto, maior aceitação e agregar valor econômico aos produtos alimentícios. Grande parte dos ingredientes pigmentantes utilizados na agroindústria e pelos sistemas de produção animal é representada por carotenoides de origem sintética, obtidos por meio de processos químicos caracterizados por apresentar elevados custos de produção, que são repassados ao comprador. Por outro lado, atualmente, existe uma demanda pela substituição dos compostos sintéticos por fontes naturais de nutrientes para serem utilizados principalmente em alimentação animal (PASSOS et al., 2007; VALDUGA et al., 2009).

A produção de carotenoides por via biotecnológica concorre diretamente com a produção sintética realizada pelas grandes empresas químicas do setor. As plantas e os micro-organismos fotossintetizantes, como as algas, as cianobactérias e as bactérias fototróficas representam importantes fontes para a biossíntese natural desses pigmentos. Além disso, alguns micro-organismos não fotossintetizantes como bactérias, fungos e leveduras também possuem a capacidade de produzir pigmentos carotenoides de grande interesse para as indústrias (GOODWIN, 1981; VALDUGA et al., 2009).

A biomassa de leveduras, microalgas e bactérias fototróficas contendo pigmentos carotenoides vem sendo investigada como ingrediente pigmentante na alimentação animal. Dentre esses organismos, destacam-se: a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as microalgas dos gêneros *Clorella*, *Haematococcus* e *Dunaliella*, e as bactérias *Rhodospseudomonas sphaeroides* e *Rubrivivax gelatinosus* (AVANÇO et al., 2014; DEL CAMPO et al., 2007; DERNER et al., 2006; LORENZ; CYSEWSKY 2000; LU et al., 2011; PASSOS et al., 2007; POLONIO et al., 2010; PONSANO et al., 2004a; 2004b; PONSANO et al., 2011; TINOI et al., 2006).

Dentre o grupo de bactérias fototróficas, as bactérias púrpuras representam um grupo versátil, predominantemente aquático, capaz de crescer na ausência de oxigênio. *Rubrivivax gelatinosus* é uma bactéria púrpura gram-negativa do grupo das não sulfurosas (BPNS) encontrada em ambientes aquáticos, no solo, em valas de esgotos e lodos, e em efluentes industriais

(HOLT et al., 2000). Seus pigmentos fotossintetizantes incluem a bacterioclorofila tipo *a* e os carotenoides da série esferoidene (esferoidene, hidroxiesferoidene e espiriloxantina), principais responsáveis pela coloração vermelho-púrpura desenvolvida em seus cultivos (AGALIDIS et al., 1999; BROCK et al., 1994; HOLT et al., 2000; PONSANO et al., 2002a). Outra importante característica dessa bactéria é a rica composição proteica de suas células com uma quantidade balanceada de aminoácidos essenciais. Adicionalmente, a biomassa da bactéria apresenta carboidratos, lipídeos, matéria mineral e os oxicarotenoides característicos do grupo (PONSANO, et al., 2003; 2011; SANTO et al., 2013; SASAKI et al., 1981).

A biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* já foi testada em experimentos que comprovaram sua capacidade pigmentante em comparação com ingredientes sintéticos tradicionais utilizados na produção de frangos de corte (AVANÇO et al., 2014; PONSANO et al., 2002b; 2004b), ovos (POLONIO et al., 2010; PONSANO et al., 2004a) e tilápias (PONSANO et al., 2014). As condições de crescimento do micro-organismo em diversos meios de cultivo, buscando as condições necessárias para a maior recuperação da biomassa, também foram analisadas, sendo correlacionadas com a adaptação da bactéria a efluentes agroindustriais, de onde retiram os componentes nutricionais necessários para o seu crescimento (LIMA et al., 2011a; 2011b; PONSANO et al., 2008; SANTO et al., 2013). O cultivo dessa bactéria em efluentes industriais promove o equivalente a um tratamento despoluente biológico, possibilitando o reuso de águas para outras atividades na indústria. Além disso, permite a geração de um coproduto pigmentante com valor agregado (LIMA et al., 2011a; 2011b; PONSANO et al., 2008).

A atual produção de biomassas bacterianas, no entanto, se restringe à estudos laboratoriais e carece de informações econômicas para possibilitar a expansão da atividade ao setor industrial. A busca na literatura científica por informações a respeito da viabilidade de processos de obtenção de biomassa bacteriana para fins pigmentantes em alimentação animal, por exemplo, resultou nula. Por outro lado, Molina Grima et al. (2003), Olaizola (2003), Sthepens et al.

(2010) e Li et al. (2011), são exemplos de autores que avaliaram o potencial biotecnológico de microalgas para a produção de pigmentos naturais e biocombustíveis em escala industrial, respaldados por estudos de mercado e análises econômicas. Esse tipo de avaliação prévia é importante para as empresas, pois também permite a identificação de potenciais gargalos que ocorrerão durante a comercialização dos seus produtos (MOLINA GRIMA et al., 2003).

A avaliação financeira e econômica de um determinado projeto é realizada por meio de estudos de engenharia e economia com o intuito de estimar os desembolsos e as receitas que ocorrerão ao longo do tempo da implantação e funcionamento da atividade. Com esses dados, são calculados os indicadores de viabilidade e rentabilidade econômica utilizados para a análise do mérito do projeto, visando à seleção das melhores condições para o início da produção (BRASIL, 2008; BUARQUE, 1994; KASSAI et al., 2000).

O objetivo do estudo foi avaliar a viabilidade econômica de um projeto para a obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* em escala industrial, utilizando o efluente de indústria de abate e processamento de pescado como substrato para o cultivo bacteriano.

Material e Métodos

Reativação, preparo do inóculo e cultivo bacteriano

A bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* foi previamente isolada e caracterizada com base em testes morfológicos, bioquímicos e pelo espectro de absorção de pigmentos fotossintetizantes (PONSANO et al., 2002a).

O inóculo, desenvolvido em duas etapas, foi preparado em recipientes de vidro com tampa utilizando meio de *Pfennig* líquido acrescido da solução de microelementos, biotina e tiamina, conforme descrito por Lima et al. (2011a). O inóculo foi considerado pronto para o uso após o quarto dia, ao atingir densidade

ótica de aproximadamente 0,500 a 600 nm.

O efluente utilizado como substrato para o crescimento do micro-organismo foi colhido de uma indústria de abate e processamento de tilápias, localizado no Estado de São Paulo, com vazão aproximada de 120.000 L. dia⁻¹. No laboratório, o material foi tratado termicamente a 65°C por 30 min em tanque de aço inox (INCOMAR) e, posteriormente, resfriado para 28°C, temperatura considerada adequada para o início do crescimento do micro-organismo.

O inóculo (1% v/v) foi adicionado ao efluente já acondicionado no biorreator de vidro (capacidade 50 L) e o cultivo foi desenvolvido por cinco dias na temperatura de 30 ± 2°C sob iluminação de lâmpadas incandescentes de 60 W (1.500 ± 200 lux) e anaerobiose, fornecida pelo completo enchimento dos reatores e fechamento com tampas de vidro. Foram realizadas três repetições concomitantes do cultivo.

Determinação da Produtividade

Após o período de cultivo, o conteúdo dos bioreatores foi filtrado em sistema com unidade de filtração de 0,75 m², porosidade de 0,2 µm, vazão de 1,5 m³ h⁻¹ e pressão de 1,5 bar (FRINGS). O material concentrado foi congelado a -42°C, liofilizado por 48 horas (LIOBRÁS L101), triturado em almofariz, pesado, embalado a vácuo e armazenado em refrigerador ao abrigo da luz. Para o cálculo de produtividade foi utilizada a fórmula descrita na Eq. 1, segundo Aiba (1982):

(Eq. 1) $P = \frac{B}{V \times t}$, onde:

P = produtividade (g biomassa Litros⁻¹. dia⁻¹);

B = Biomassa recuperada no sistema (g);

V = Volume do substrato utilizado no cultivo (L);

t = Tempo de cultivo (dia).

Estimativa da produção em escala industrial

A análise técnica e econômica do processo para a obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* foi realizada com base em uma atividade capaz de atender à demanda por produtos pigmentantes comerciais para a alimentação animal. Para isso, foram estabelecidas algumas condições para a produção: a unidade produtora utilizaria diariamente 60.000 L de efluente proveniente das etapas de abate e processamento do pescado e a produção seria realizada em período integral, 365 dias do ano, para gerar o produto pigmentante destinado à distribuição e comercialização. Os cultivos seriam conduzidos por cinco dias, período considerado ideal com base em estudos realizados por Lima et al., (2011b), e a produção dos pigmentos seria realizada em biorreatores de aço inoxidável. Diariamente, 59.400 L de efluente industrial seguiriam para uma de cinco baterias contendo 12 biorreatores de aço inoxidável com iluminação e capacidade para 5.000 L cada, já contendo 600 L de inóculo bacteriano (1% v v⁻¹). O fluxo seria diário e contínuo para abastecer todas as baterias de biorreatores e assegurar a recuperação da biomassa depositada no sistema durante os cinco dias de cultivo (Figura 1).

Após o período de cultivo, os biorreatores contendo *Rubrivivax gelatinosus* seriam esvaziados, permanecendo no sistema 1% do volume total de cada biorreator (inóculo para novo cultivo), e o material seria destinado para a microfiltração (10 m³ h⁻¹) e separação da biomassa. O volume total do concentrado seria reduzido para 100 L e o permeado seria destinado para as lagoas de estabilização da empresa, enquanto que a biomassa concentrada seria desidratada em liofilizadores (100 kg h⁻¹).

O produto final de *Rubrivivax gelatinosus* seria comercializado em três quantidades, similares aos produtos pigmentantes comerciais: 200 g (30%), 1.000 g (47%) e 5.000 g (23%). Como estratégia de comercialização para permitir maior competitividade do produto em relação aos pigmentos tradicionais no mercado, foram considerados preços de venda do produto final 70%, 60%,

50% e 40% inferiores ao menor preço praticado no mercado para os pigmentos sintéticos no mercado.

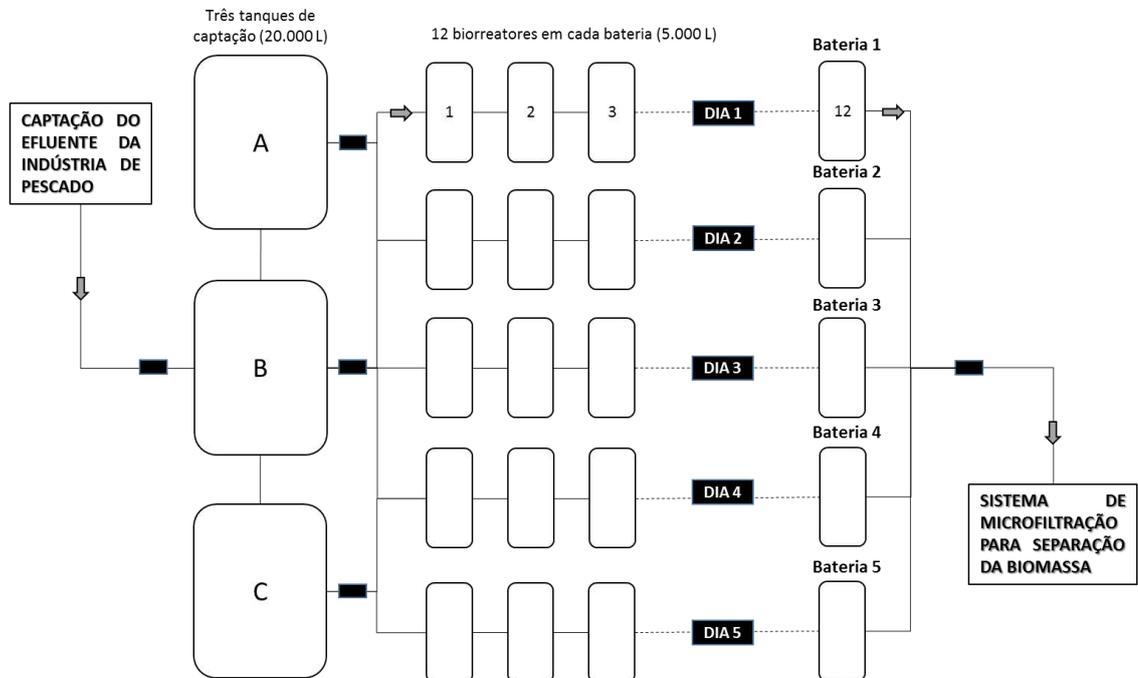


FIGURA 1 – Ilustração dos tanques de captação de efluente industrial do processamento de pescado para o planejamento do cultivo de *Rubrivivax gelatinosus* nos biorreatores e recuperação de biomassa.

Indicadores econômicos

A soma de todos os investimentos fixos com o capital de giro corresponde ao investimento total necessário para o início de uma atividade industrial. Foram considerados como investimentos fixos: obras, equipamentos e mobiliários essenciais à produção e ao processamento de biomassa bacteriana. Adicionalmente, foi incluída uma taxa para credenciamento na Associação Brasileira de Automação Comercial, referente ao uso de código de barras em produtos industrializados. O cálculo das necessidades de capital de giro considerou itens de rápida renovação para o início do projeto, como: matéria-

prima, ingredientes, embalagens, material de limpeza, reagentes, produtos acabados e em processo, reservas de caixa para pagamentos de serviços e peças para reposição.

Os custos de produção foram calculados conforme metodologia proposta por Matsunaga et al. (1976) que avalia o custo operacional efetivo (COE) e o custo operacional total (COT) da atividade. Nesse estudo, o COE considerou despesas com mão-de-obra, insumos e serviços terceirizados para análises laboratoriais. O COT foi obtido do valor do COE acrescido de impostos, seguros da unidade industrial e depreciação, calculada pelo método de depreciação linear. O custo total da produção (CTP) dos pigmentos bacterianos foi obtido da soma do custo de oportunidade da indústria ao COT, considerando os preços praticados em dezembro de 2014 para a implantação de uma agroindústria no Estado de São Paulo.

Para a análise da viabilidade econômica foi considerada a premissa de que receitas e despesas aconteceriam após intervalos de tempo iguais, constituindo um fluxo de caixa, em que entradas e saídas de capital ocorridas durante um ano se concentrariam no último dia de dezembro. O horizonte de dados utilizado para estimar os futuros fluxos de caixa foi fixado em 10 anos, a uma taxa mínima de atratividade (TMA) de 10 % ao ano, obtida da média das taxas de juros interbancárias registradas no Sistema Especial de Liquidação e Custódia (SELIC), projetada pelo Banco Central do Brasil entre junho e dezembro de 2014. Em seguida, foram calculados o Valor Presente Líquido (VPL), que corresponde à soma algébrica de uma série de fluxos de caixa descapitalizada pela TMA, desde a data de início da operação, e a Taxa Interna de Retorno (TIR), considerada a taxa de juros que torna o VPL igual a zero, sendo um indicativo da rentabilidade do projeto. Adicionalmente, também foram calculados o índice de lucratividade (IL) e de rentabilidade (IR), o Tempo de Retorno de Capital (TRC) ou *pay-back* e o Ponto de Equilíbrio (PE) (BRASIL, 2008; NOGUEIRA, 2007).

Para o cálculo do VPL, utilizou-se a fórmula (Eq 2.):

(Eq. 2) $VPL = \sum_{j=0}^n a_j (1 + i)^{-j}$, onde:

i = taxa de desconto considerada;

j = índice para o período;

a_j = fluxo de caixa no j -ésimo período;

n = horizonte de tempo dos projetos.

A TIR foi definida como sendo a taxa de desconto w na fórmula (Eq. 3):

(Eq. 3) $\sum_{j=0}^n a_j (1 + w)^{-j} = 0$, onde:

w = TIR;

j = índice para o período;

a_j = fluxo de caixa no j -ésimo período;

n = horizonte de dados.

O IL, parcela da receita que representa o lucro da atividade, foi obtido pela fórmula (Eq. 4):

(Eq. 4) $IL = \frac{Rt - Ct}{Rt} \cdot 100$, onde:

IL = índice de lucratividade (%);

Rt = receita total;

Ct = custo total.

O IR, capacidade da atividade gerar rendimentos em relação ao capital imobilizado no projeto, foi calculado pela fórmula (Eq. 5):

(Eq. 5) $IR = \frac{Lo}{Capt} \cdot 100$, onde:

IR = índice de rentabilidade (%);

Lo = lucro operacional;

Capt = capital total investido.

O *pay-back*, período de retorno do investimento, foi calculado pela fórmula (Eq. 6):

$$(Eq. 6) TRC = \frac{Capi}{Rt - CVt} \cdot 100, \text{ onde:}$$

TRC = tempo de retorno de capital (anos);

Capi = capital inicial investido;

Rt = receita total;

CVt = custo variável total.

Resultados e Discussão

O cultivo de *Rubrivivax gelatinosus* gerou $21,8742 \pm 0,08$ g de biomassa e a produtividade média foi de $0,0875$ g biomassa $L^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Com esse resultado, a estimativa anual da produção de pigmentos bacterianos da unidade industrial foi de 9,58 toneladas, considerando a utilização de 21.900 m^3 de efluente.

Diferentes substratos foram utilizados para o cultivo desse micro-organismo resultando em produtividades inferiores ao encontrado neste experimento. Ponsano et al. (2003) e Ponsano et al. (2008), por exemplo, avaliaram a habilidade da bactéria em se desenvolver no efluente de abatedouro avícola e encontraram $0,072$ e $0,085$ g biomassa $L^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente. Em outra situação, Lima et al. (2008) e Lima et al. (2011b) constataram o potencial do micro-organismo em se desenvolver no efluente de processamento de pescado, e reportaram produtividades de $0,060$ e $0,079$ g biomassa $L^{-1} \text{ dia}^{-1}$, respectivamente.

Para o cálculo do investimento total do projeto, o custo em obras e

equipamentos foi estimado em R\$ 6.065.696,18 (Tabela 1), sendo o item de maior dispêndio (57,67%) atribuído aos biorreatores, representados pelos tanques de aço inoxidável com iluminação artificial para permitir o crescimento fotoheterotrófico do micro-organismo. Altos custos nesse tipo de aquisição são esperados e representam um dos maiores entraves para a exploração industrial, pois é importante que o sistema estabeleça as condições propícias para o desenvolvimento de micro-organismos fotossintetizantes. Moscoso et al. (2012), por exemplo, realizaram um estudo com *Pseudomonas stutzeri* para remediação de efluentes contendo fenantreno, um hidrocarboneto policíclico aromático potencialmente tóxico. Segundo os autores, a aquisição de biorreatores representou mais de 65% do investimento em equipamentos para o cultivo da bactéria. Situação semelhante também foi verificada por Molina Grima et al. (2003) para a aquisição de fotobiorreatores destinados ao cultivo de *P. tricornutum*. Os autores relataram a necessidade de 75 biorreatores tubulares para garantir uma produção anual de 26,2 toneladas de biomassa da microalga marinha para obtenção de ácido graxo eicosapentaenoico.

No cálculo das necessidades de capital de giro, foram incluídos itens de rápida renovação para assegurar uma produção inicial, compromissos de salários, prazos para comercialização do produto e pagamentos de fornecedores o que totalizou R\$ 295.760,33 (Tabela 1). Conseqüentemente, o valor total em investimento estimado para a unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* foi de R\$ 6.361.456,51.

Na Tabela 2 estão apresentados o COE, o COT e o CTP da biomassa, incluindo alguns coeficientes técnicos que foram calculados para alguns itens de insumos. Para o cálculo do CTP, foi adicionado ao COT o valor de R\$ 327.716,19 referente aos custos de oportunidade da indústria. Esse valor corresponde à possíveis *déficits* de rendimentos previstos sobre a opção de se investir o capital em uma determinada atividade industrial (NOGUEIRA, 2007).

Tabela 1 – Estimativas do investimento total para uma unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* no interior do estado de São Paulo, 2014

Descrição*	Quantidade	Unidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Terreno	1.000	m ²	30,00	30.000,00
Terraplenagem	1.000	m ²	8,00	8.000,00
Indústria (área principal)	500	m ²	880,00	440.000,00
Indústria (administração)	100	m ²	950,00	95.000,00
Casa de caldeira	40	m ²	500,00	20.000,00
Redes externas e internas ¹	35	m ²	180,00	6.300,00
Estudos e projetos de engenharia ²	4	%	-	23.972,00
Imprevistos ²	1,75	%	-	10.487,75
Investimento total em obras				633.759,75
Biorreatores de aço inoxidável (5 m ³)	60	Un.	58.300,00	3.498.000,00
Tanques de captação em polipropileno (20 m ³)	3	Un.	22.280,00	66.840,00
Sistema de microfiltração (10 m ³ h ⁻¹)	2	Un.	180.000,00	360.000,00
Bombas centrífuga	9	Un.	1.300,00	11.700,00
Liofilizador (100 kg batelada ⁻¹)	2	Un.	127.000,00	254.000,00
Mesa de aço inoxidável	2	Un.	2.890,00	5.780,00
Equipamentos microbiologia ³	-	-	-	29.542,90
Equipamentos para embalagem ⁴	-	-	-	17.790,00
Equipamentos de informática	-	-	-	7.600,00
Veículo	1	Un.	26.000,00	26.000,00
Material de escritório	-	-	-	16.200,00
Montagem ⁵	20	%	-	848.514,58
Linhas externas ⁵	2	%	-	101.901,75
Segurança e proteção contra incêndio ⁶	1	%	-	50.950,87
Eventuais ⁶	1	%	-	50.950,87
Frete dos equipamentos ⁵	2	%	-	84.851,46
Taxa de associação da EAN**	1	Un.	-	1.314,00
Investimento total em equipamentos				5.431.936,43
Necessidades de capital de giro				295.760,33
Investimento total do projeto				6.361.456,51

¹Considerado para instalações de redes elétricas, água, esgoto e vapor. ²Considerado sobre o valor total do investimento em obras. ³Conjunto de equipamentos necessários para elaboração do inóculo de *Rubrivivax gelatinosus*, adicionado anualmente no sistema. ⁴Conjunto de equipamentos comuns para setor de embalagens e armazenamento do produto pigmentante (seladora a vácuo, balança e paleteira manual). ⁵Considerado sobre o valor total dos equipamentos da indústria. ⁶Considerado sobre o valor total dos equipamentos da indústria, montagens e linhas externas. ⁷Considerado soma dos itens de rápida renovação (insumos), reservas de caixa para pagamentos de salários e para cobrir vendas realizadas a prazo (30 dias). *Os equipamentos foram agrupados por categorias para melhor representação na tabela. **EAN – A Associação Brasileira de Automação Comercial.

Tabela 2 – Estimativas do custo operacional efetivo (COE), custo operacional total (COT) e custo total de produção (CTP) anuais para uma unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* no interior do estado de São Paulo, 2014

Item	CT ¹ (kg de biomassa)	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Insumos			
Matéria-prima (efluente industrial)	2,2 m ³ kg ⁻¹	0,00	0,00
Insumos não estocáveis (energia)	68,27 kWh kg ⁻¹	0,32	209.280,00
Insumos não estocáveis (água)	0,76 m ³ kg ⁻¹	6,73	49.129,00
Lenha	0,11 m ³ kg ⁻¹	42,00	45.444,00
Material de limpeza	0,30 kg kg ⁻¹	9,80	28.616,00
Material de embalagens	-	-	13.359,77
Material de microbiologia ²	-	-	3.121,84
Despesas administrativas ³	-	-	21.988,76
Serviços			
Salários fixos ⁴	-	-	243.698,40
Mão-de-obra ⁵	-	-	127.861,93
Análises laboratoriais	-	-	6.949,80
Custo Operacional Efetivo (COE)			749.449,50
Depreciação ⁶			580.297,63
Impostos e taxas ⁷			466.657,58
Manutenção e imprevistos			149.328,16
Seguros da unidade industrial ⁸			53.973,19
Vendas ⁹			38.709,13
Custo Operacional Total (COT)			2.038.415,19
Custos de oportunidade ¹⁰			327.716,19
Custo Total da Produção (CTP)			2.366.131,38

¹Coefficiente técnico para produção anual de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*. ²Meios de cultivo para o preparo do inóculo para crescimento de *Rubrivivax gelatinosus*. ³Despesas fixas de telefonia, internet e aquisição de material consumível de escritório. ⁴Salários mais encargos trabalhistas para um quadro fixo de 11 funcionários (Gerente comercial, contador, secretário, portaria, limpeza, mecânico e caldeirista). ⁵Serviços de mão-de-obra temporária na indústria (especializada e não especializada). ⁶Depreciação da unidade industrial (20 anos), equipamentos (10 anos) e veículos (5 anos). ⁷Relativo a impostos territoriais (1 %), ICMS (12 %) e taxas EAN (Associação Brasileira de Automação Comercial). ⁸Considerado 0,12 % para obras civis, 1,2 % para equipamentos e 8,5 % para veículos. ⁹Relativo a comissões de venda do produto (1% da receita total anual). ¹⁰Considerado 6 % sobre o valor do terreno e dos equipamentos.

O efluente industrial, matéria-prima para o crescimento de *Rubrivivax gelatinosus*, foi considerado como item de custo zero para efeito de cálculo do COE (Tabela 2). Essa condição demonstra uma importante vantagem do projeto pois, ao mesmo tempo que reduz o CTP do produto pigmentante, apresenta uma forma de reutilização do resíduo descartado. De acordo com Kirby et al., (2003),

o reuso de efluentes, quando viável, pode significar uma alternativa importante para diminuir o desperdício hídrico observado nas indústrias alimentícias.

O custo médio de produção anual de biomassa (9.580 kg) foi de R\$ 247,00 kg⁻¹ e a receita anual foi estimada em R\$ 3.870.913,15, considerando que o preço final desse produto seria 70% do menor preço do produto pigmentante encontrado no mercado. Na Tabela 3 estão demonstrados os custos e os lucros obtidos para cada unidade do produto pigmentante bacteriano.

Tabela 3 – Custos unitários e lucros econômicos para cada unidade do produto pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus* considerando seu valor de venda 70% do menor preço praticado pela concorrência no interior do estado de São Paulo, 2014

Produto pigmentante bacteriano	Custo de produção da biomassa (R\$)	Custo do produto comercial¹ (R\$)	Valor de venda da biomassa² (R\$)	Lucro econômico da biomassa (R\$)
Biomassa 200 g	49,39	128,00	89,60	40,21
Biomassa 1.000 g	246,95	590,00	413,00	166,05
Biomassa 5.000 g	1.234,75	2.350,00	1.645,00	410,25

¹Valores dos produtos sintéticos com efeito pigmentante similar contendo 8% do princípio ativo astaxantina em outubro de 2014. ²Preço de venda considerado da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* como 70% do valor do produto pigmentante comercial.

Variações realizadas no preço médio de venda de novos produtos influenciam o valor final das receitas geradas com sua comercialização (OLIVEIRA et al., 2004). Conseqüentemente, a estratégia de se reduzir o valor comercial da biomassa (produto novo) em relação aos pigmentos sintéticos (produtos tradicionais já estabelecidos no mercado) foi necessária para possibilitar maior competitividade. A partir dos resultados, foi possível identificar uma flexibilidade desse projeto ao permitir ganhos econômicos mesmo considerando valores de venda muito abaixo dos preços praticados pela concorrência. A análise dos resultados também demonstrou que as receitas geradas no projeto são maiores que o CTP, o que se traduz em lucros econômicos para a empresa. Segundo Nogueira (2007), situações em que as receitas não são suficientes para cobrir os custos operacionais e os custos de

produção significam colapso da atividade econômica com tendência à depreciação dos bens e dificuldade para se recuperar o capital investido.

Os produtos pigmentantes utilizados na alimentação animal são conhecidos pelos altos valores praticados no mercado (MILEDGE, 2010; OLAIZOLA, 2003; SPOLAORE et al., 2006). Takahashi et al. (2008) discutiram várias estratégias utilizadas para a inclusão de ingredientes pigmentantes no cultivo de trutas. Dentre os principais gargalos para a expansão da atividade, destacou-se o alto preço do produto comercial contendo 8% do princípio ativo astaxantina (US\$ 302,00 kg⁻¹). Em outra situação, quando são analisados os custos de produção somente do princípio ativo astaxantina, o valor pode ultrapassar US\$ 2.500,00 kg⁻¹ (MILEDGE, 2010; SPOLAORE et al., 2006). Ressalta-se, portanto, a competitividade da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* que apresentou um custo inferior ao menor preço de mercado dos pigmentos sintéticos utilizados na produção animal (Tabela 3).

Os índices IL e IR da biomassa foram 38,87% e 23,65%, respectivamente (Tabela 4). Esses resultados demonstraram que 38,87% da receita gerada da produção dos pigmentos bacterianos se referem ao lucro obtido pela atividade econômica. Além disso, a biomassa foi capaz de gerar 23,65% de rendimentos em relação ao capital imobilizado no negócio. Esses índices são importantes para comparar o resultado econômico gerado por diferentes projetos agroindustriais. Li et al. (2011) desenvolveram um estudo econômico para o cultivo de *Haematococcus pluvialis* em larga escala, objetivando a recuperação de biomassa para a produção de astaxantina. A partir dos dados apresentados pelos autores, foi possível calcular um IL de 36,91% e um IR de 19,90%, considerando uma receita anual de US\$ 792.000,00 obtida com a produção de 36 toneladas da microalga. Comparativamente, os índices analisados demonstraram vantagens do projeto de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, apesar dos produtos obtidos em ambos os cultivos serem diferentes em relação ao princípio ativo pigmentante.

Os indicadores econômicos do projeto estão resumidos na Tabela 4. Os critérios adotados para a avaliação econômica indicaram viabilidade da

produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* com base nos resultados do VPL (R\$ 4.466.192,26) e da TIR (23,70%). Quando a avaliação de um projeto é realizada de forma independente, desconsiderando outras possibilidades de investimentos, pode-se afirmar sua viabilidade se o VPL for positivo e se a TIR for superior a TMA (BATALHA, 2007; BUARQUE, 1994; NOGUEIRA, 2007). O estudo avaliou o projeto em um horizonte de 10 anos e a uma TMA de 10% ao ano. Nesse período, as receitas geradas pela atividade superariam os gastos com investimentos e os custos operacionais, retornando o capital investido em, aproximadamente, quatro anos. Stephens et al. (2010) também realizaram estudos de viabilidade do processo de obtenção de biomassa de microalgas gerando produtos com alto valor agregado (β -caroteno) e com potencial bioenergético. As avaliações foram feitas em um horizonte de 30 anos e revelaram uma TIR de 15% para um projeto técnico com produtividade de 20 g de biomassa seca $m^{-2} \text{ dia}^{-1}$, em uma área de 500 ha e a um custo de US\$ 600 kg^{-1} do produto pigmentante.

O PE é um indicador da flexibilidade de operação de uma fábrica e representa o ponto em que, considerando variações sobre a quantidade de produto beneficiado, as receitas se igualam aos custos (BATALHA, 2007; BUARQUE, 1994; NOGUEIRA, 2007). O resultado obtido na análise do projeto de *Rubrivivax gelatinosus* revelou flexibilidade no investimento com valor de 44,97% (Tabela 4). Um menor percentual do PE demonstra que a indústria pode operar abaixo da sua capacidade sem colocar todo o empreendimento em risco.

Os indicadores apresentados na Tabela 4 demonstraram um cenário positivo para a implantação da unidade de produção de pigmentos bacterianos. Entretanto, algumas condições, tais como a TMA e o preço de venda do produto, são pré-estabelecidas para a obtenção dos resultados econômicos e quaisquer modificações nesses valores podem alterar a viabilidade do projeto técnico.

As TMA, consideradas para a análise de diferentes projetos agroindustriais, podem ser utilizadas de acordo com taxas usuais praticadas por linhas de créditos rurais e industriais de bancos privados (variável), juros de poupança (baixo risco) ou taxa média de juros interbancários registrados no

SELIC (taxa referencial dos juros básicos praticados pelo governo). Pela Figura 2, é possível constatar que, quando se eleva a TMA para valores acima de 22%, aumenta a probabilidade de se inviabilizar a atividade de produção de pigmentos de *Rubrivivax gelatinosus* em função dos resultados negativos do VPL ao longo de 10 anos de duração da atividade econômica. Embora esse valor seja considerado de grande risco, a margem percentual de juros abaixo de 22% confere versatilidade ao projeto pela ampliação das possibilidades de alternativas de investimentos com diferentes taxas de desconto.

Tabela 4 – Indicadores financeiros e econômicos para um projeto de unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* considerando o preço de venda da biomassa 70% do menor preço encontrado no mercado para o produto sintético pigmentante

Indicadores financeiros e econômicos	Unidade	Valor
Custo total	R\$	2.366.131,38
Receita total	R\$	3.870.913,15
Lucro operacional	R\$	1.504.781,77
VPL	R\$	4.466.192,26
TIR	%	23,70
PE	%	44,97
IL	%	38,87
IR ¹	%	23,65
TRC	anos	3,98

VPL – valor presente líquido; TIR – taxa interna de retorno; PE – ponto de equilíbrio; IL – índice de lucratividade; IR – índice de rentabilidade; TRC – tempo de retorno de capital; ¹IR calculado utilizando o lucro operacional (sem os custos de oportunidade).

Variações no preço de venda dos produtos bacterianos pigmentantes podem alterar os indicadores econômicos do projeto técnico e interferir na sua viabilidade. Na Tabela 5 foram avaliadas três situações considerando diferentes preços de venda da biomassa bacteriana em relação ao menor preço do produto similar encontrado no mercado para pigmentação animal. De acordo com os resultados, é possível viabilizar a comercialização do produto bacteriano mesmo com o valor final reduzido pela metade do menor preço de mercado (situação 2, Tabela 5). Por outro lado, o aumento do preço de venda sensibilizaria os

indicadores econômicos do projeto podendo tornar inviável a atividade pelos valores negativos do lucro econômico, VPL, IL e IR (situação 3, Tabela 5). Estudos que avaliaram a viabilidade econômica de processos industriais encontraram situações semelhantes com alterações realizadas no preço final de seus produtos, no valor do investimento inicial do projeto e na quantidade de biomassa gerada a partir do cultivo de microalgas em larga escala (LI et al., 2012; MONCADA et al., 2014; STEPHENS et al., 2010). Além disso, valores desejáveis de VPL e TIR estão diretamente relacionados com menores custos operacionais e com o aumento das receitas obtidas, o que proporciona uma melhor condição econômica para os projetos.

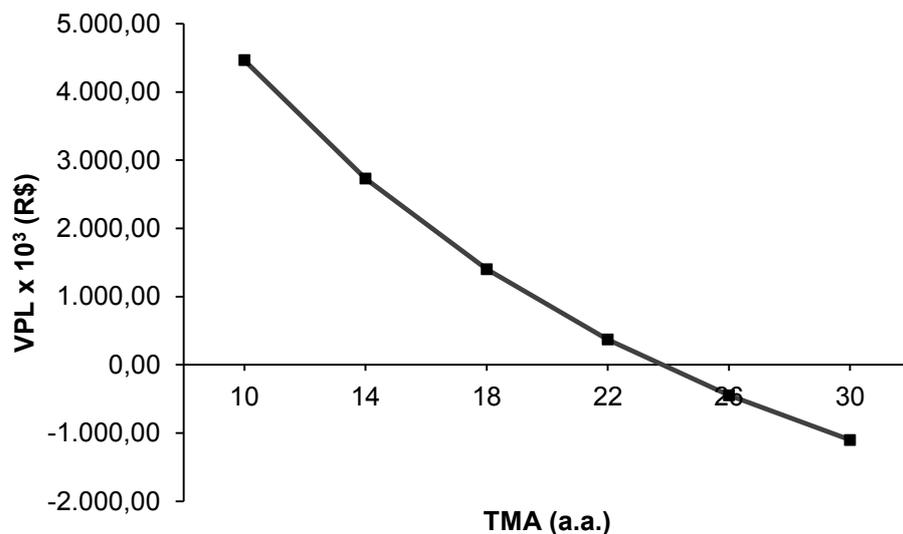


FIGURA 2 – Variação da taxa mínima de atratividade (TMA) anual para os cálculos do valor presente líquido (VPL) no projeto para obtenção de produto pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus* no interior do estado de São Paulo, 2014.

Os custos totais de produção apresentados na Tabela 5 indicaram inviabilidade do processo de obtenção da biomassa quando o preço de venda correspondesse a 40% do menor valor praticado pela concorrência (situação 3). Nessa simulação, a TIR foi considerada inferior à TMA (10% a.a.) adotada pelo projeto e o PE aumentou consideravelmente, elevando o período de retorno do

capital investido para o próximo do tempo total de duração da análise do projeto (10 anos). Na simulação em que o preço de venda foi reduzido à metade do valor do produto sintético, a TIR foi praticamente igual à TMA (10% a.a.), sinalizando um risco para produção. Essa sensibilização da TIR em relação aos preços da biomassa também foi verificada por Stephens et al. (2010) quando avaliaram o cultivo de microalgas para a produção de óleo e produtos de alto valor agregado. De acordo com os autores, três fatores são relevantes para considerar a viabilidade do projeto para cultivo de micro-organismos: reduzir custos de biorreatores para os cultivos, aumentar a produtividade e o rendimento da biomassa microbiana e agregar valor comercial aos coprodutos elaborados.

Tabela 5 – Indicadores econômicos para um projeto de unidade de produção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* considerando variações do preço de venda da biomassa em relação ao menor preço encontrado no mercado para o produto sintético pigmentante

Indicadores financeiros e econômicos	Variação no preço de venda da biomassa de <i>Rubrivivax gelatinosus</i>		
	Situação 1 (60%) ¹	Situação 2 (50%) ²	Situação 3 (40%) ³
Investimento total* (R\$)	6.354.494,18	6.347.531,84	6.340.569,49
Custo total* (R\$)	2.294.242,99	2.222.354,60	2.366.131,38
Receita total (R\$)	3.317.925,56	2.764.937,96	2.150.466,22
Lucro operacional (R\$)	1.023.682,57	542.583,36	(215.665,16)
VPL (R\$)	2.400.534,93	334.877,60	(1.730.779,73)
TIR (%)	17,55	11,09	4,14
PE (%)	54,57	69,39	95,24
IL (%)	30,85	19,62	(10,03)
IR** (%)	16,11	8,55	(3,40)
TRC (anos)	4,91	6,63	9,29

VPL – valor presente líquido; TIR – taxa interna de retorno; PE – ponto de equilíbrio; IL – índice de lucratividade; IR – índice de rentabilidade; TRC – tempo de retorno de capital; ¹Condição que configura o preço de venda da biomassa como 60% do menor preço do produto pigmentante similar encontrado no mercado. ²Condição que configura o preço de venda da biomassa como 50% do menor preço do produto pigmentante similar encontrado no mercado. ³Condição que configura o preço de venda da biomassa como 40% do menor preço do produto pigmentante similar encontrado no mercado. *Variações no preço de venda alteram o investimento e os custos totais por considerar nos cálculos o capital de giro que inclui as necessidades de vendas do produto a prazo como garantia para o início da atividade. **IR calculado utilizando o lucro operacional (sem os custos de oportunidade).

Conclusão

O projeto para a obtenção de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* em efluente de processamento de pescado em escala industrial mostrou-se viável economicamente, sendo possível recuperar todo o capital investido em até quatro anos de atividade da indústria. O cenário foi considerado positivo pelos indicadores econômicos obtidos e com a comercialização do produto bacteriano abaixo do preço de mercado do pigmentante sintético.

Referências

AGALIDIS, I.; MATTIOLI, T.; REISS-HUSSON, F. Spirilloxanthin is released by detergent from *Rubrivivax gelatinosus* reaction center as an aggregate with unusual spectral properties. **Photosynthesis Research**, v. 62, p. 31-42, 1999.

AIBA, S. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms. **Advances Biochemistry Engineering**, v. 23, p. 85-156, 1982.

AVANÇO, S. V.; PONSANO, E. H. G.; GARCIA-NETO, M.; PINTO, M. F. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na criação de frangos de corte: desempenho animal e cor dos produtos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1831-1838, 2014.

BATALHA, M. O. **Gestão agroindustrial: GEPAI Grupo de estudos e pesquisas agroindustriais**. 4^a ed., São Paulo: Atlas, 2007.

BRASIL, H. G. **Avaliação moderna de investimentos**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2008.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINGO, J. M.; PARKER, J. **Biology of**

microorganisms. New York: Prentice Hall, 1994.

BUARQUE, C. **Avaliação econômica de projetos: uma apresentação didática**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1994.

DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 1163-1174, 2007.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.

GOODWIN, T. W. The biochemistry of the carotenoids. **Biosynthesis**, v. 1, p. 578-602, 1981.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

KASSAI, R.; KASSAI, S.; SANTOS, A.; ASSAF-NETO, A. **Retorno de investimento: abordagem matemática e contábil do lucro empresarial**. São Paulo: Atlas, 2000.

KIRBY, R. M.; BARTRAM, J.; CARR, R. Water in food production and processing: quantity and quality concerns. **Food Control**, v. 14, p. 283-299, 2003.

LI, H.; CHEN, Q.; ZHANG, X.; FINNEY, K. N.; SHARIF, V. N.; SWITENBANK, J. Evaluation of a biomass drying process using waste heat from process industries: a case study. **Applied Thermal Engineering**, v. 35, p. 71-80, 2012.

LI, J.; ZHU, D.; NIU, J.; SONGDONG, S.; WANG, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Hametococcus pluvialis*.

Biotechnology Advances, v. 29, p. 568-574, 2011.

LIMA, L. K. F.; PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G. Produtividade e redução da carga poluente na obtenção de biomassa em resíduo de processamento de pescado. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E XV SIMPÓSIO LATINO AMERICANO E DO CARIBE DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2008. Belo Horizonte. **Anais eletrônicos** ... Belo Horizonte: SBCTA, 2008.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. Cultivation of *Rubrivivax gelatinosus* in fish industry effluent for depollution and biomass production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2553-2558, 2011a.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. Recuperation of bacterial biomass produced in the treatment of industry effluent. **Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 456-462, 2011b.

LORENZ, R.; CYSEWSKI, G. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends Biotechnology**, v. 18, p. 160-167, 2000.

LU, H.; ZHANG, G.; WAN, T.; LU, Y. Influences of light and oxygen conditions on photosynthetic bacteria macromolecule degradation: Different metabolic pathways. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9503-9508, 2011.

MATSUNAGA, M.; BEMELMANS, P. F.; TOLEDO, P. E. N.; DULLEY, R. D.; OKAWA, H.; PEDROSO, I. A. Metodologia de custo de produção utilizada pelo Instituto de Economia Agrícola. **Boletim Técnico do Instituto de Economia Agrícola**, v. 23, p. 123-139, 1976.

MILLEDGE, J. Commercial applications of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Reviews of Environment Science and Biotechnology**, v. 10, p. 31-41, 2010.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E.; ACIÉN FERNANDEZ, F. G.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

MONCADA, J.; TAMAYO, J. A.; CARDON, C. A. Integrating first, second and third generation biorefineries: incorporating microalgae into the sugarcane biorefinery. **Chemical Engineering Science**, v. 118, p. 126-140, 2014.

MOSCOSO, F.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Technoeconomic assessment of phenanthrene degradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930 in a batch bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 81-89, 2012.

NOGUEIRA, M. P. Gestão de custos e avaliação de resultados: agricultura e pecuária. 2ª ed., Bebedouro: Scot Consultoria, 2007.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLIVEIRA, F.; COSTA, S. M. A. L.; TARSIANO, M. A. A.; SANT'ANA, A. L. Produção de mel na região noroeste do Estado de São Paulo: um estudo de caso de produtor familiar. **Informações Econômicas**, v. 34, p. 15-24, 2004.

PASSOS, R.; MORIEL, D. G.; LAGREZE, F.; GOUVEIA, L.; MARASHIN, M.; BEIRÃO, L. H. Fontes naturais de carotenoides de interesse para a aquicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 2, p. 103-113, 2007.

POLONIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M. Utilization of bacterial (*Rubrivivax gelatinosus*) biomass for egg yolk pigmentation. **Animal Production Science**, v. 50, p. 1-5, 2010.

PONSANO, E. H. G.; GRASSI, T. L. M.; SANTO, E. F. E.; MARCOS, M. T. S.; CAVAZZANA, J. F.; PINTO, M. F. Color and carotenoids in tilapia fish feed different carotenoids. In: 60th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY (ICoMST), 2014, Punta Del Este. **Anais eletrônicos** ... Punta Del Este: ICoMST, 2014.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Achieves of Biology and Technology**, v. 46, p. 143-147, 2003.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Brazilian Achieves of Biology and Technology**, v. 45, p. 445-449, 2002a.

PONSANO, E. H. G.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C. From a pollutant byproduct to a feed ingredient. In: MANTOVIC, D. (Ed.) **Biomass - detection, production and usage**. Croatia: InTech, 2011. pp. 461-472.

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

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P. M. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. **Journal Applied of Poultry Research**, v. 11, p. 77-82, 2002b.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M. LACAVA, P. M. Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 6, p. 237-242, 2004a.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M. LACAVA, P. M. *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for egg yolk pigmentation. **Journal Applied Poultry Research**, v. 13, p. 421-425, 2004b.

SANTO, E. F. E.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 47-51, 2013.

SASAKI, K.; NOPARATNARAPORN, N.; HAYASHI, M.; NISHIZAWA, Y.; NAGAI, S. Single-Cell protein production by treatment of soybean wastes with *Rhodopseudomonas gelatinosa*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, p. 471-477, 1981.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STEPHENS, E.; ROSS, I.; KING, Z.; MUSSGUG, J.; KRUSE, O.; POSTEN, C. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 28, p. 126-128, 2010.

TAKAHASHI, N.S.; TSUKAMOTO, R.Y.; TABAT, Y.A.; RIGOLINO, M.G. Truta salmonada: processo produtivo em constante aprimoramento no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 105, p. 28-33, 2008.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Utilization of mustard waste isolates for improved production astaxanthin by *Xanthophylomyces dendrorhous*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 309-314, 2006.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

APÊNDICE A – Normas para envio do artigo à revista World Journal of Microbiology and Biotechnology

World Journal of Microbiology and Biotechnology

http://www.springer.com/chemistry/biotechnology/journal/11274?detailsPage=pltc1_1060769

Editor-in-Chief: Peter J. Large

ISSN: 0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0972 (electronic version)

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Format

Manuscripts should be divided into the following sections:

- Title page
- Abstract
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion; the Discussion section must not recapitulate the Results
- Acknowledgements
- References
- Figure legends
- Figures
- Tables

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- **Journal article**
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- **Article by DOI**
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- **Book**
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- **Dissertation**
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

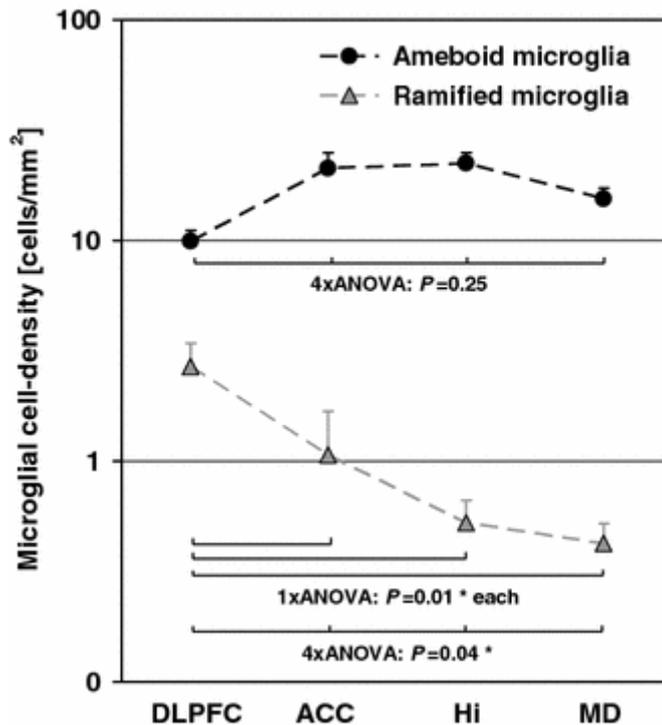
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

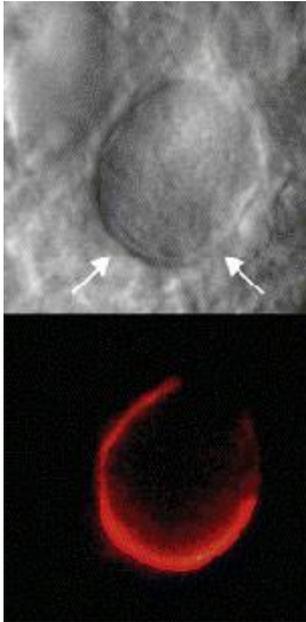
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



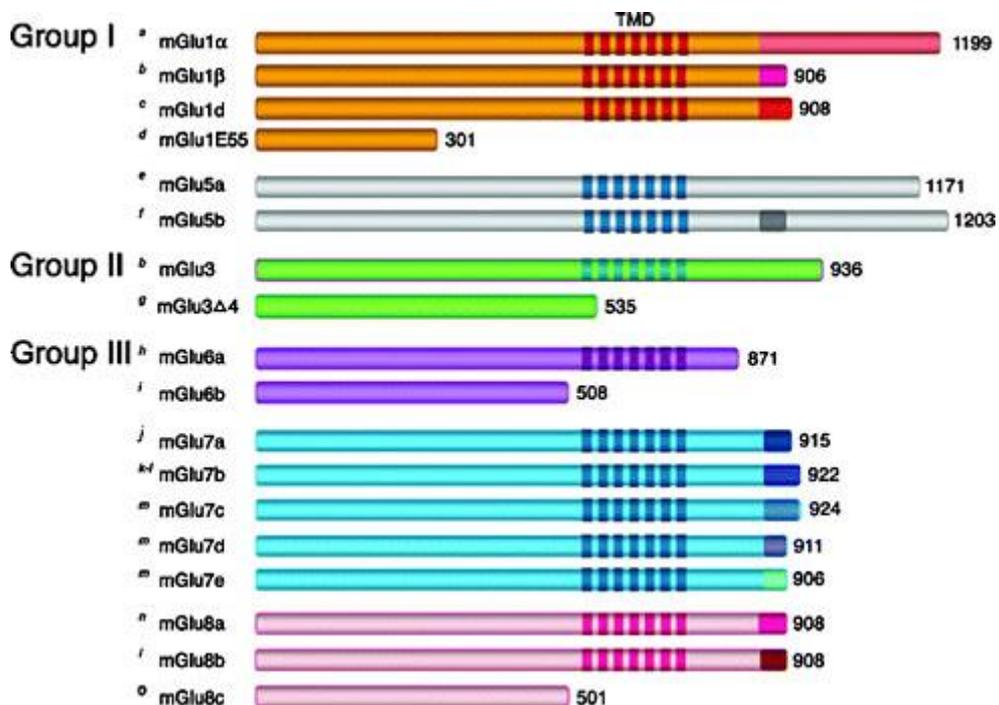
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)