



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Agrárias

Departamento de Aquicultura

Curso de Engenharia de Aquicultura

**PRODUÇÃO DE PROBIÓTICO PARA CULTIVO COMERCIAL DE SURUBINS
HÍBRIDOS (BANDEIRANTES-MS)**

Gabriel Fernandes Alves Jesus

Florianópolis

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Agrárias

Departamento de Aquicultura

Curso de Engenharia de Aquicultura

Gabriel Fernandes Alves Jesus

**PRODUÇÃO DE PROBIÓTICO PARA CULTIVO COMERCIAL DE SURUBINS
HÍBRIDOS (BANDEIRANTES-MS)**

Trabalho de conclusão apresentado ao curso
de graduação de Engenharia de Aquicultura
da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Walter Quadros Seiffert

Florianópolis

2011

JESUS, GABRIEL FERNANDES ALVES

PRODUÇÃO DE PROBIÓTICO PARA CULTIVO COMERCIAL DE
SURUBINS HÍBRIDOS (BANDEIRANTES-MS)

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO II

CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

FLORIANÓPOLIS/SC – BRASIL

34 PÁGINAS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Walter Quadros Seiffert, pela orientação e oportunidade e conselhos ao longo do curso.

À minha família que sempre me incentivou e ofereceu tantas oportunidades tanto para o meu estudo quanto para o meu crescimento pessoal.

Aos meus colegas, amigos, e professores que colaboraram muito para minha aprendizagem e formação.

Aos companheiros de laboratório (LCM) que sempre prestam apoio e fazem com que o trabalho diário seja harmônico, eficiente e não se torne estressante.

A empresa Mar & Terra pela recepção, hospedagem, oportunidade, aprendizado ao longo do período de trabalho.

Aos amigos do setor de microbiologia que estão e/ou estiveram comigo (Gabriella P, Gabriela S, Marcello, Mariana, Norha, Katiane, Robert), onde convivemos, aprendemos, trocamos experiências, trabalhamos, demos risadas e nos esforçamos diariamente para realização de nossos objetivos.

Aos chefes e amigos José Luiz Mouriño, Bruno Corrêa, Felipe Vieira e Adolfo Jatobá por todos os ensinamentos, conselhos, oportunidades, momentos e pela confiança depositada em mim ao longo desses anos.

À Jose Luiz Mouriño e Bruno Corrêa, pela oportunidade, pela tranquilidade passada e por todo apoio prestado em minha permanência na fazenda para realização desse trabalho.

A minha amiga e namorada Cláudia, por me acompanhar durante todo o período da graduação, em momentos bons e em outros que se tornaram ainda melhores.

A todos que de alguma maneira já participaram dos “futebas” de segunda-feira, nosso ponto de encontro obrigatório após o expediente.

*" Muda que quando a gente muda o mundo muda com a gente,
A gente muda o mundo na mudança da mente,
E quando a mente muda a gente anda pra frente,
E quando a gente manda ninguém manda na gente!
Na mudança de atitude não há mal que não se mude nem doença sem cura
Na mudança de postura a gente fica mais seguro
Na mudança do presente a gente molda o futuro!."*

Gabriel, o Pensador (Até Quando!)

RESUMO

Com o objetivo de reduzir perdas nos cultivos de surubins híbridos com sintomas de bacteriose, surgiu a necessidade de estudos de monitoramento microbiológico e dedesenvolvimento de produtos preventivos a estas doenças e que aumentasse a imunocompetência dos peixes. O objetivo do trabalho foi implantar um laboratório de microbiologia, para monitoramento microbiológico e produção intensiva de probiótico em uma fazenda de larvicultura e alevinagem de surubins híbridos (*P.corruscans* X *P. fasciatum*). Através do monitoramento foram realizadas contagens de bactérias das larvas, sistema de abastecimento de água, aeração e outros acessórios para estabelecer os críticos para a larvicultura. Além disso, o probiótico foi inoculado na ração na concentração de 100mL para cada quilograma de ração. O experimento teve duração de sete dias e contou com dois tratamentos, o suplementado com probiótico e o não suplementado com probiótico, alimentando peixes na larvicultura e em sistema de *raceways*. Foi mensurado o ganho em peso e taxa de sobrevivência dos animais. A colonização por parte das bactérias ácido-lácticas ficou evidente, tanto na ração quanto no trato intestinal das larvas, chegando a 8×10^8 e $2,15 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente. Os juvenis nos *raceways* apresentaram, também, boa colonização, com cerca de $9,16 \times 10^8$. O tratamento suplementado com probiótico apresentou menor ganho em peso, porém uma maior homogeneidade de crescimento dos animais, da mesma forma que apresentou maior sobrevivência quando comparado ao tratamento não suplementado. O mesmo aconteceu no sistema de *raceways* onde se constatou maior sobrevivência dos animais suplementados. Foi possível verificar a eficiência da utilização de probiótico a campo como suplemento alimentar de surubins híbridos, onde se obteve um crescimento mais homogêneo dos lotes. O monitoramento se mostrou uma ferramenta muito útil para padronização de manejos na fazenda, se tornando fundamental para prevenção de enfermidades e garantia de peixes mais saudáveis.

Palavras-chave: Probiótico, *Wisella cibaria*, *Pseudoplathystoma* sp.,

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2.DEFINIÇÃO DE PROBIÓTICO	13
3. OBJETIVO DO TRABALHO	15
4. JUSTIFICATIVA.....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 CEPA PROBIÓTICA	15
5.2 INSTALAÇÃO DO LABORATÓRIO	16
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	16
.4 MONITORAMENTOS MICROBIOLÓGICOS	17
5.4.1 ÁGUA.....	17
5.4.2 PEIXES.....	19
5.5 PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DO PROBIÓTICO	19
5.5.1 PRODUÇÃO ESCALONADA DE PROBIÓTICO	19
5.5.2 CONTAGEM TOTAL DA RAÇÃO, DAS LARVAS E DO TRATO INTESTINAL DOS PEIXES.....	21
5.5.3 COLORAÇÃO DE GRAM.....	22
5.7 BOAS PRÁTICAS DE MANEJO.....	23
5.8 ANÁLISE DOS DADOS ESTATÍSTICOS.....	23
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6.1. MONITORAMENTO DE ÁGUA I	23
6.2. MONITORAMENTO DE ÁGUA II	25
6.3. CONTAGEM TOTAL DO INÓCULO	26
6.4. CONTAGEM TOTAL DA RAÇÃO.....	26
6.5 CONTAGEM BACTERIOLÓGICA DO TRATO DOS ANIMAIS.....	28
6.6. GANHO EM PESO E SOBREVIVÊNCIA NA LARVICULTURA.....	30
6.7. GANHO EM PESO E SOBREVIVÊNCIA DE JUVENIS EM MINI RACEWAYS.....	31
6.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho e esquema da definição de probiótico, biocontrolador, e bioremediador. (Adaptado de Gatesoup, 1999).	13
Figura 2: Esquema do sistema de distribuição de água e pontos de coleta para monitoramento da água.	18
Figura 3: Incubadora com exemplo de escalonamento de produção	20
Figura 4 : Escalonamento da produção de probiótico	21
Figura 5: Morfologia da bactéria <i>Weissella cibaria</i> vista através da coloração Gram	22
Figura 6: Contagem de bactérias totais em TSA (UFC em log). em diferentes pontos de coleta.	24
Figura 7: Concentração de Bactérias Totais no Duto de Ar em Log x (UFC/mL)	25
Figura 8: Concentração de bactérias totais em TSA (UFC em log x), em pontos específicos.	25
Figura 9: Coloração de Gram das bactérias crescidas em meio de cultura MRS. (A) bactéria crescida dieta inoculada. (B) e (C), bactérias crescidas em dietas não inoculadas.	27
Figura 10: Contagem inicial e final de bactérias totais (TSA) e ácido-lácticas (MRS) no trato das larvas.	28
Figura 11: Contagem inicial e final de bactérias totais (TSA) e ácido-lácticas (MRS) de juvenis do mini raceway.	29
Figura 12: Ganho em peso dos animais suplementados e não suplementados com probiótico.	30
Figura 13: Mortalidade total das larvas nas calhas entre os dois tratamentos. P=0,08	31
Figura 14: Mortalidade acumulativa na larvicultura.	31
Figura 15: Mortalidade média de juvenis em <i>miniraceways</i> alimentados ou não com probiótico.	32
Figura 16: Mortalidade cumulativa de juvenis em mini raceways alimentados ou não com probiótico.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de bactérias ácido-lácticas (UFC) em meio MRS.	27
Tabela 2: Contagem de bactérias totais (UFC/mL) na ração em diferentes tempos de inoculação.	27
Tabela 3: Contagem inicial e final do trato intestinal das calhas e nos Mini <i>raceways</i> (M.RW) em larvas alimentadas com probiótico e não alimentadas com probiótico (algo assim) .	28

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o ramo do agronegócio mundial que vem se desenvolvendo continuamente. De acordo com Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2010) a produção mundial de pescados em 2008, envolvendo a pesca extrativa (90.800.160 t) e a aquicultura (68.348.943 t), foi de 159.149.103 t.

Na composição da produção mundial da aquicultura destacam-se quatro grandes grupos: peixes (49,9%), plantas aquáticas (23,09%), moluscos (19,16%) e crustáceos (7,33%), ficando os outros organismos aquáticos com 0,95%. Em relação à receita, os produtos advindos da aquicultura renderam US\$ 105,8 bilhões, cuja participação do segmento da piscicultura foi de aproximadamente 57% (FAO, 2010).

De acordo com o MPA (2010), a produção de pescados no Brasil foi de 1.240.813,1 t, sendo a produção aquícola de 415.649 t (cerca de 33,5% do total). A produção brasileira da aquicultura continental foi de 337.353 t, o que representa 81,16% da aquicultura do país.

Segundo dados da empresa Mar & Terra, especializada na criação e processamento de espécies de peixes nativos brasileiros, como o pintado e o pacu, provenientes da região do Pantanal; pirarucu e o tambaqui, da Amazônia. Foi fundada em 2003 e sua sede localiza-se no estado do Mato Grosso do Sul, na cidade de Itaporã, a 230 km de Campo Grande. O setor de larvicultura da empresa localiza-se na cidade de Bandeirantes (MS), a aproximadamente 80Km de Campo Grande.

As espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. fasciatum* apresentam variações no nome e correspondência nas diferentes regiões de ocorrência, sendo mais conhecidos como pintado e cachara, respectivamente. O *P. corruscans* possui um padrão de manchas pretas circulares sobre todo o corpo, enquanto o *P. fasciatum* apresenta um tipo mais variado, frequentemente, formado por faixas pretas irregulares que lembram o padrão tigrado de pigmentação. Pertencem à família Pimelodidae, a qual compreende os maiores bagres de água doce da América do Sul. (Zaniboni, 2003).

Esses peixes apresentam excelente qualidade de carne, pouca presença de espinhos, alto valor no mercado e a vantagem de serem espécies nativas bastantes procuradas pelos exportadores. O pintado apresentou um incremento no volume de

produção de 821,5 t (2003) a 2.126,70 t (2009), representando 120% de crescimento que visa atender a demanda nacional e internacional (MPA, 2010).

Em muitas espécies nativas, como: o pacu, o tambaqui e o matrinxã, as larvas são povoadas em viveiros após quatro a cinco dias de idade até se tornarem juvenis prontos para a engorda. Por sua vez, as larvas do surubim e do cachara necessitam ser criadas em laboratório e tanques tipo *raceway* até que se tornem juvenis, já que os melhores resultados em viveiros de engorda estão sendo obtidos quando são estocados peixes entre 12 e 20cm de comprimento. Apesar das técnicas empregadas, a sobrevivência média de juvenis prontos para a comercialização é aproximadamente de 30 a 40% (INOUE *et al.*, 2002). Estudos relacionados à larvicultura de peixes nativos do Brasil vêm se desenvolvendo rapidamente, no entanto, ainda são poucos os relacionados com o surubim (CAMPAGNOLO & NUÑER, 2006).

Segundo Kubitza *et al.* (1998), a complexa reprodução, larvicultura e alevinagem dos surubins restringe o número de produtores de juvenis. Além de aspectos de qualidade e demanda nutricional relacionado às fases iniciais do cultivo, uma série de enfermidades pode acometer o cultivo, como surtos, principalmente, de aeromoniose e columnariose.

Durante surtos de enfermidades, diversos agentes químicos podem ser utilizados como tratamentos profiláticos e remediadores às enfermidades, tais como ácido acético, amônia quaternária, cal, cloreto de sódio, formol, iodo, metrifonato, sulfato de cobre, verde malaquita, ácido oxolínico, sulfamerazina, sulfato de magnésio e especialmente os antibióticos. Estes últimos, diversas vezes, são utilizados indiscriminadamente e de maneira errônea.

O uso inadequado destes agentes normalmente ocorre quando não se conhece o agente causador do surto de enfermidade e/ou mortalidade, obrigando produtores a utilizar antibióticos com grande espectro de atuação. Alguns desses agentes são, tanto as bactérias Gram positivas, quanto as negativas, além de alguns protozoários. Medidas inadequadas podem provocar a seleção e a resistência dos patógenos (KLAENHAMMER & KULLEN, 1999), além de serem uma fonte de poluição ambiental (BOYD & MASSAUT, 1999) e poderem prejudicar a comercialização e saúde humana devido à presença de resíduo nos tecidos dos animais tratados (SAPKOTA *et al.*, 2008).

No cenário mundial atual, onde a produção sustentável é indispensável, buscam-se soluções alternativas para o combate às enfermidades, modificando o pensamento, de remediativo para preventivo. Dessa forma, estaremos descartando a utilização de químicos e adotando medidas que visam a prevenção enfermidades, melhorando a saúde do animal, trabalhando com o manejo adequado, alimentação de qualidade e utilização de probiótico.

2.DEFINIÇÃO DE PROBIÓTICO

De acordo com Gatesoupe (1999), probiótico para aquicultura são: “células microbianas que são adicionadas de maneira que entrem no trato digestivo dos animais, mantendo-se vivas, com o objetivo de melhorar a saúde do animal”.



Figura 1: Desenho e esquema da definição de probiótico, biocontrolador, e bioremediador. (Adaptado de Gatesoup, 1999).

Segundo Gatesoupe (1999), micro-organismos que apenas melhoram a qualidade do ambiente de cultivo (biorremediadores ou bioaumentadores) e diminuem a carga de bactérias patogênicas na água (biocontroladores) não atuando diretamente nos organismos cultivados, não são considerados probióticos (Figura 1). Porém, alguns poucos micro-organismos podem ser adicionados de diferentes maneiras aos tanques de cultivo atuando diretamente nos animais.

Com o aumento na produção de rejeitos resultante da intensificação dos cultivos, os ambientes saem de seu equilíbrio e sofrem modificações que podem

trazer prejuízos ao produtor. Dessa forma, segundo Moriarty (1998), para minimizar essas alterações no meio, a aplicação de microrganismos (utilizados para melhorar a qualidade de água) são considerados biorremediadores.

Já os micro-organismos biocontroladores, possuem a capacidade de reduzir a concentração dos agentes patogênicos no ambiente de cultivo. Entre esses estão os do gênero *Vibrio* (não patogênicos) e as microalgas. Os mesmos podem ser ministrados diretamente nos tanques de cultivo ou em forma de alimento vivo, reduzindo a carga de bactérias patogênicas presentes na água e no biofilme (MAKRIDIS *et al.*, 2006 e KARUNASAGAR *et al.*, 2007).

Uma cepa candidata a probiótica deve apresentar uma série de características específicas favoráveis de maneira que, quanto maior o número dessas características, maior é a eficiência do probiótico (MERRIFIEL, 2010). Dessa forma, um microrganismo probiótico deve:

- Ser apatogênico, não apenas para espécies de animais aquáticos, mas também para os humanos consumidores;
- Não deve apresentar genes de resistência a antibióticos;
- ser resistente aos sais biliares e baixo pH;
- aderir-se à mucosa intestinal e apresentar um bom crescimento;
- ser capaz de colonizar a superfície do epitélio intestinal;
- ser registrado como um aditivo alimentar;
- atividade antagônica aos principais patógenos da espécie. No exemplo dos surubins, principalmente a *Aeromonas hydrophila*;
- produzir enzimas digestivas e/ou vitaminas;
- Ser endógena do hospedeiro, apresentando maior especificidade;
- Apresentar certa resistência para procedimentos normais de inclusão em dietas e/ou processamentos industriais.

Segundo Copolla e Gil-Turnes (2004), os probióticos, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, têm efeito imunomodulador. Em organismos aquáticos, há interesse especial em aumentar a resistência às doenças, aumentando a eficiência do complexo hematoimunológico do animal.

3. OBJETIVO DO TRABALHO

O objetivo do trabalho foi implantar um laboratório de microbiologia, para monitoramento microbiológico do sistema de cultivo e produção intensiva de probiótico em uma fazenda de larvicultura e alevinagem de surubins híbridos (*P. corruscans* X *P. fasciatum*).

4. JUSTIFICATIVA

Para reduzir perdas nos cultivos de surubins híbridos com sintomas de bacteriose, surgiu a necessidade de estudos que fortalecessem a atividade através de métodos de prevenção frente aos patógenos. Dessa forma, em 2007, foi iniciado um trabalho para seleção de uma cepa probiótica capaz de diminuir as mortalidades na fazenda de piscicultura Mar & Terra Ltda, além da realização de análises para monitoramento dos peixes. O investindo da empresa em sanidade manteve o laboratório de microbiologia atrelado à produção, visando uma maior produtividade através de ferramentas microbiológicas que garantem maior saúde aos peixes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CEPA PROBIÓTICA

A cepa probiótica utilizada no trabalho foi isolada por Mouriño *et al.* (2010). , de surubins híbridos sadios provenientes do cruzamento entre pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*).

Mouriño *et al.*(2011), triou uma série de cepas candidatas a probióticas de surubins híbridos sadios. Através de uma série de análises microbiológicas e fisiológicas, pôde-se selecionar a cepa que apresentou os melhores resultados nos mais diferentes testes “in vitro”. Após isso, foram realizados testes “em vivo” (escala laboratorial) que apresentaram ótimos resultados dos peixes alimentados com a cepa probiótica selecionada.

A cepa selecionada foi a que apresentou um dos melhores resultados nas avaliações *in vitro* de halos de inibição frente à bactéria *Aeromonas hydrophila* e outros patógenos conhecidos. Nos ensaios de viabilidade de produção *in vitro*, a cepa selecionada (*Weissella cibaria*) apresentou os melhores índices de colonização

da dieta (ração), sendo capaz de reduzir o pH do meio para 3,85. No ensaio *in vivo*, foi possível detectar a alteração na microbiota intestinal causada pela cepa probiótica, demonstrando a sua capacidade de colonização e potencial probiótico para surubins híbridos. Porém, ainda faltavam os testes a campo em grande escala.

A cepa avaliada no ensaio de colonização foi identificada molecularmente como *W. cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02).

5.2 INSTALAÇÃO DO LABORATÓRIO

A instalação de um laboratório de microbiologia foi na fazenda de reprodução, larvicultura e alevinagem da empresa Mar & Terra, localizada na cidade de bandeirantes no Mato Grosso do Sul, a 80km de Campo Grande.

O laboratório conta com diversos equipamentos para realização dos processos microbiológicos. Dentre eles destacamos: autoclave, incubadora, geladeira, freezer, bico de Bunsen, entre outros.

Com isso, o laboratório produziu cerca de 20 litros de probiótico diariamente, atendendo uma demanda de 200Kg de ração/dia. Essa ração foi fornecida nos estágios iniciais da larvicultura, até o momento em que os animais foram encaminhados para a engorda, com o comprimento médio de 14 cm.

Além da produção massiva de probiótico, o laboratório foi utilizado para o controle da qualidade da água do cultivo, qualidade das larvas e alevinos, diagnósticos de enfermidades, controle de desinfecção e boas práticas de manejo.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento da larvicultura teve duração de sete dias, onde dez calhas foram utilizadas com surubins híbridos de aproximadamente 2,5cm. Cinco calhas foram alimentadas com a ração contendo probiótico (tratamento) e as outras cinco sem suplementação de probiótico (controle).

Foram realizadas duas pesagens para estimativa de ganho em peso: uma no início do experimento e outra no final. Os animais mortos eram retirados três vezes ao dia, para verificação da sobrevivência após os sete dias de experimento.

A renovação era constante, de aproximadamente 400-500% ao dia, quanto nas calhas.

A ração úmida fornecida aos animais era confeccionada diariamente, onde. A alimentação dos animais era realizada de hora em hora, alimentando-se primeiramente os animais do controle e, em seguida, os do tratamento, evitando a contaminação da ração.

Animais foram coletados antes do início do experimento e ao final do experimento (sétimo dia), para análise de ganho de peso, contagem e verificação de bactérias no trato intestinal.

No experimento de engorda dos juvenis em sistema *raceway*, a metodologia de confecção da ração, alimentação e parâmetros analisados, foram os mesmos do experimento na larvicultura.

Os parâmetros de qualidade de água nos *raceways* também não se mantiveram constantes, porém as variações naturais existentes ocorriam em todas as calhas, já que a origem da água era a mesma para todas as unidades. As médias dos parâmetros analisados foram: oxigênio dissolvido $4,93 \pm 1,43$; temperatura de $27,8 \pm 0,56$; pH de $7,2 \pm 0,28$. Os níveis de amônia, nitrito e nitrato foram mantidos em concentrações muito baixas.

Os parâmetros de qualidade de água não se mantiveram constantes, porém as variações naturais existentes ocorriam em todas as calhas, já que a origem da água era a mesma para todas as unidades. As médias dos parâmetros analisados foram as seguintes: Oxigênio dissolvido $5,05 \pm 1,06$; temperatura de $27,5 \pm 1,04$; pH de $7,0 \pm 0,33$. Os níveis de amônia, nitrito e nitrato foram mantidos em concentrações muito baixas.

.4 MONITORAMENTOS MICROBIOLÓGICOS

5.4.1 ÁGUA

Para conhecer o estado microbiológico da água que abastece os laboratórios de produção de larvas, foi necessário realizar, quinzenalmente, análises microbiológicas no sistema hidráulico. Esta metodologia consiste no monitoramento através da contagem total de bactérias em Ágar TSA, Ágar TCBS e CETRIMID Ágar, de pontos estratégicos do sistema e o diagnóstico bacteriológico da água, onde os animais foram cultivados.

As amostras para análise foram representativas obedecendo às normas para tomada de amostras, segundo sua procedência (filtros, tanques, cisternas e tubulações). Os frascos utilizados foram esterilizados em autoclave, as amostras foram semeadas logo após a coleta. Quando não foi possível semear as amostras neste período de tempo, as amostras foram mantidas a 4°C por no máximo 24 horas.

A contagem das placas levou em consideração todas as bactérias heterotróficas, aeróbias e anaeróbias facultativas, mesófilas e psicrófilas capazes de crescer em meio de Ágar nutritivo. Para fazer esta contagem, utilizaram-se placas com meio de cultura sólido Ágar TSA, TCBS, e CETRIMID nos quais foram semeados volumes conhecidos de água. A temperatura e o tempo de incubação utilizado foram 30°C por 24-48 horas.

A fazenda conta com um sistema de distribuição de água (Figura 2), o qual foi monitorado, a fim de se padronizar concentrações ideais de bactérias que apontaram a qualidade da água no cultivo e dos animais que ali estavam.

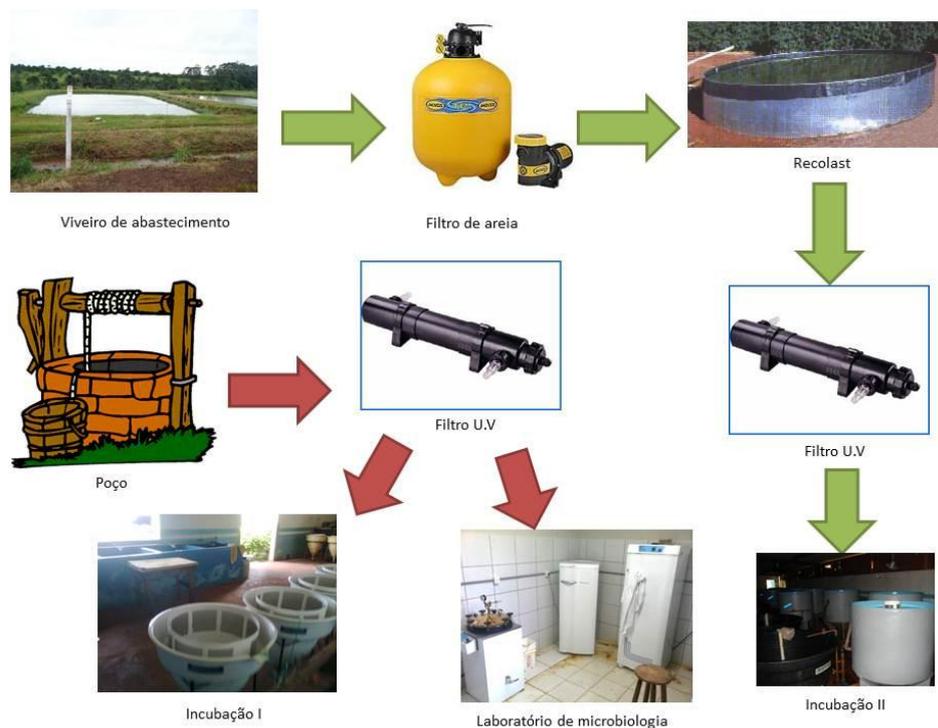


Figura 2: Esquema do sistema de distribuição de água e pontos de coleta para monitoramento da água.

Para realização da contagem de bactérias totais nas amostras de água, seguiu-se o protocolo. Primeiramente, foi realizada a homogeneização da amostra de água recém coletada em tubos estéreis, para posterior diluição seriada. Em

seguida, plaqueou-se as diluições desejadas em meios específicos (TSA, CETRIMID, TCBS). As amostras foram incubadas a 30°C por 24 horas.

5.4.2 PEIXES

Para a realização de um diagnóstico dos animais cultivados é necessário a utilização de técnicas bacteriológicas, as quais consistem no macerado de larvas, ou de órgãos dos animais. Para isso, realizaram-se as contagens totais de bactérias em diferentes meios de culturas, semeadas com o macerado de larvas, para as larvas no sistemas de calhas, e dos órgãos, nos sistemas de *raceways*.. Os meios de cultura utilizados foram: Ágar sangue para bactérias hemolíticas totais, TCBS Ágar para *Vibrio*, KF Ágar para *Streptococcus*, entre outros.

Em seguida foi feita verificação da concentração de bactérias ácido lácticas no trato intestinal dos animais. Dessa forma, foi quantificado o número dessas bactérias e verificado se a morfologia e as características das mesmas assemelhavam-se com a utilizada no probiótico.

5.5 PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DO PROBIÓTICO

5.5.1 PRODUÇÃO ESCALONADA DE PROBIÓTICO

Todo material antes de ser utilizado para produção do probiótico foi esterilizado utilizando autoclave. Para produção de bactérias ácido-lácticas e para manutenção da cepa utilizou-se caldo MRS. A confirmação do crescimento das colônias era realizado através de plaqueamento e contagem das amostras.

Para produção de maiores volumes de probiótico foi utilizado um meio mais econômico e de ótima eficiência para o crescimento das bactérias. Tratou-se de um meio a base de soro de leite e açúcar, nas concentrações de 80g/L e 20g/L, respectivamente. A bactéria já ativada e crescida foi inoculada em tubos com 9mL de meio MRS caldo. Os tubos recém-semeados foram incubados por 24 horas a uma temperatura de 35°C. Esses tubos, com bactérias já crescidas, foram inoculados em pequenas garrafas de 500mL de volume contendo meio de soro de leite com açúcar, na proporção de 2 tubos (20mL) por garrafa de 500mL. Essas garrafas foram incubadas seguindo os padrões da incubação anterior. Por fim, as

garrafas com bactérias já crescidas, foram inoculadas em bombonas de 20 litros, contendo meio de cultura de soro de leite, nas mesmas proporções já citadas(Figuras3 e 4).



Figura 3: Incubadora com exemplo de escalonamento de produção

É válido ressaltar, que após qualquer um dos processos de incubação e verificação de crescimento das bactérias, foram realizados testes Gram para certificação de pureza da cultura. Na última etapa, para controle antes da inoculação do probiótico na ração, avaliou-se a pureza da cultura via Gram, cheiro e sabor, sendo os dois últimos parâmetros para facilitar a interpretação do produtor sobre a cultura.

Após a verificação de pureza da cultura probiótico na bombona, foi inoculado o probiótico na ração. Dessa forma, a ração foi aspergida com cerca de 100mL/Kg do inóculo de *W. cibaria*. A ração que não utilizada foi mantida na geladeira para evitar a ação fermentativa das bactérias.

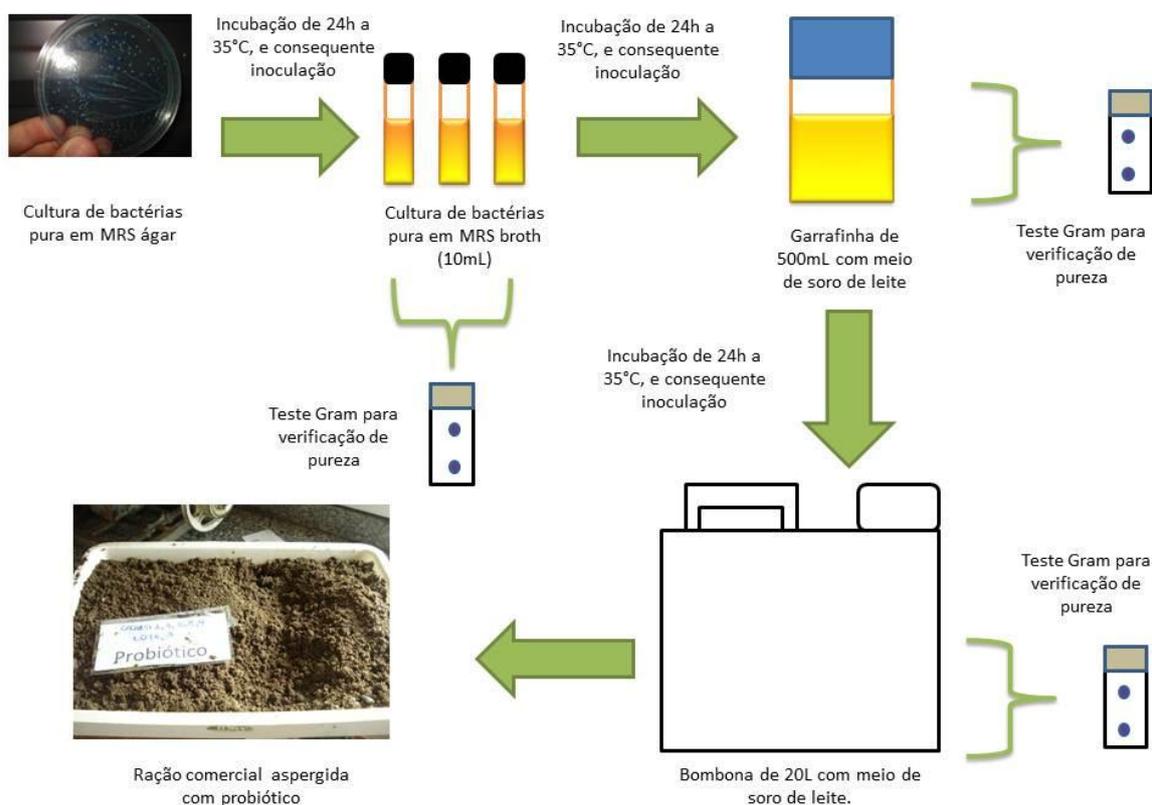


Figura 4 : Escalonamento da produção de probiótico

5.5.2 CONTAGEM TOTAL DA RAÇÃO, DAS LARVAS E DO TRATO INTESTINAL DOS PEIXES.

A metodologia para contagem de bactérias da ração, do trato, e das larvas foi semelhante, mudando apenas a forma de coleta da amostra. Para contagem da ração, foi coletado 1g de amostra da dieta; para contagem do trato, foi coletado 1g do trato intestinal do animais; e para contagem das larvas foi coletado 1g dos animais. Após isso, as amostras foram maceradas e as diluições foram realizadas consecutivamente em tubos com solução salina 0,65%. Em seguida, as soluções foram plaqueadas nas diluições desejadas e homogeneizadas em placas de Petri contendo MRS Ágar, TCBS Ágar, TSA Ágar, e Cetrimid.

A contagem do número de colônias no trato intestinal das larvas foi procedida de maneira especial para a análise da amostra, devido ao pequeno tamanho dos animais e difícil coleta do trato. A quantidade igual a 1g de larvas foi coletada lavada em álcool 70% para desinfecção externa e, em seguida, em água destilada para retirada do álcool. Após, a amostra foi macerada e realizou-se o processo microbiológico descrito anteriormente.

5.5.3 COLORAÇÃO DE GRAM

A coloração de Gram foi utilizada para a visualização da morfologia da bactéria e para a verificação da pureza da cultura (Figura 5). De acordo com esta técnica foi necessária a utilização de várias soluções. A primeira foi um corante, geralmente cristal violeta, o qual se aplica sobre a amostra reagindo com as células carregadas negativamente. Em seguida aplicou-se lugol sobre a amostra. O lugol combina-se com o corante para formar um composto insolúvel que aumenta a afinidade entre o corante e o interior da célula. Após esse processo, utilizou-se um agente descolorante como o álcool e a acetona, os quais são solventes orgânicos capazes de eliminar o corante de algumas bactérias, descolorando-as. A fucsina é uma solução contraste, de caráter básico e coloração distinta do primeiro corante, corando apenas as bactérias tingidas pelo passo anterior.

Os microorganismos que resistiram à descoloração e retiveram o cristal violeta foram classificados como Gram positivos. Aqueles que perderam a coloração inicial do cristal violeta, foram classificados como Gram negativos. Após a coloração de Gram, as bactérias foram observadas em microscópio através da imersão de óleo.

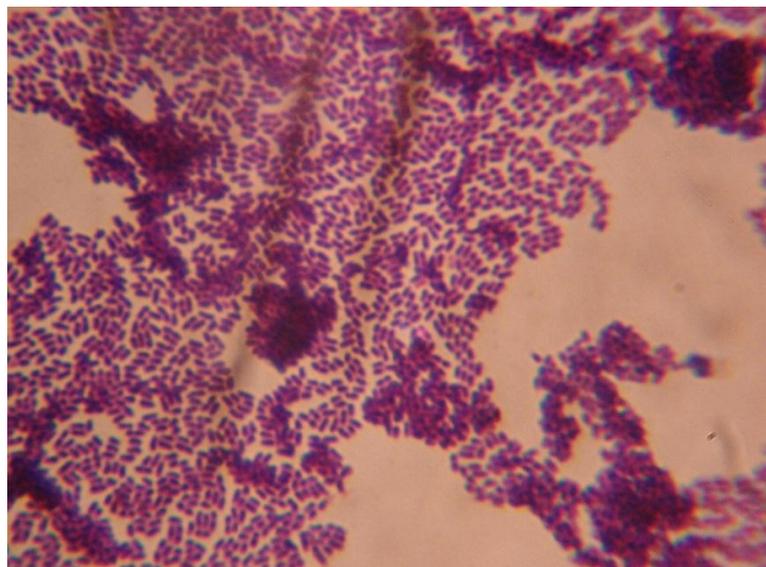


Figura 5: Morfologia da bactéria *Weissella cibaria* vista através da coloração Gram

5.7 BOAS PRÁTICAS DE MANEJO

Com o intuito de otimizar a produção na fazenda tanto no aspecto econômico quanto no sanitário, boas práticas de manejo foram passadas aos funcionários da fazenda. Através de demonstrações práticas, do crescimento de bactérias em placas, do cheiro de podridão em determinados lugares e da conscientização utilizando exemplos do cotidiano, as informações puderam ser passadas e absorvidas pelos trabalhadores.

Foi realizada uma raspagem com *Swab* nas mãos dos funcionários e posterior plaqueamento. O mesmo procedimento foi realizado nos isopores de armazenagem e transporte de ração, nas tubulações de ar que aeravam incubadoras e caixas da larvicultura e nos peixes mortos em processo de decomposição. Os resultados foram comparados com peixes saudáveis, entre outros pequenos testes que apresentavam novas informações que tornam o cultivo o mais limpo possível.

Melhorias nos procedimentos de biossegurança puderam ser notadas: limpeza e desinfecção da caixa de armazenamento e transporte da ração, utilização de pedilúvio na entrada e saída de todos os setores, utilização de álcool 70% para desinfecção das mãos antes de qualquer manejo, secagem de tubulações 24 horas antes de seu uso, utilização de materiais exclusivos para cada unidade de produção (calha, *raceway*, caixa), retirada de animais mortos ou moribundos do ambiente de cultivo e armazenamento da dieta úmida em freezer para evitar seu azedamento.

5.8 ANÁLISE DOS DADOS ESTATÍSTICOS

Os dados de ganho em peso e mortalidade foram analisados quanto à homogeneidade, seguidos de teste t para verificação de diferença de médias entre os tratamentos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. MONITORAMENTO DE ÁGUA I

No primeiro monitoramento de água, foram obtidos dados que auxiliaram o controle de alguns parâmetros de eficiência nos sistemas de filtração da fazenda. Outro importante papel desse monitoramento foi o de padronizar concentrações

máximas limites de contaminação, onde a partir de um determinado momento torna-se necessário a limpeza ou desinfecção do ponto crítico.

Podemos observar que a retrolavagem mostrou-se eficiente para a diminuição de bactérias totais na água (Figura 6), podendo ser adotada como padrão de manejo. Porém, deve-se ainda definir um tempo para realização desse manejo.

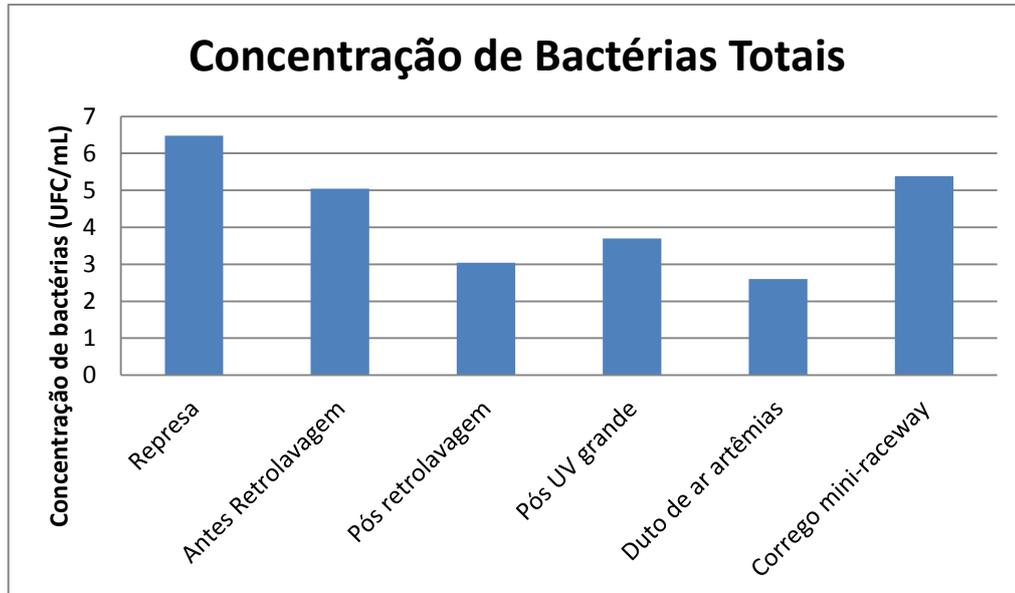


Figura 6: Contagem de bactérias totais em TSA (UFC em log). em diferentes pontos de coleta.

Em contrapartida, a concentração de bactérias totais na água, após passagem pelo U.V., apresentou um aumento quando comparada à carga bacteriana após a retrolavagem, sendo necessário definir onde está ocorrendo essa contaminação.

O duto de ar para produção de artêmia encontrava-se contaminado, sendo necessária uma desinfecção antes do início da produção. Houve crescimento de fungos na placa indicando a presença de umidade na tubulação. Essa desinfecção foi realizada pela sua secagem através do funcionamento do “blower” durante 24 e 48 horas.

Para isso, realizou-se a secagem da tubulação através do funcionamento do *Blower* durante 24 e 48 horas. Obteve-se uma diminuição na concentração de bactérias totais de 3×10^3 para 3×10^0 (figura 7).

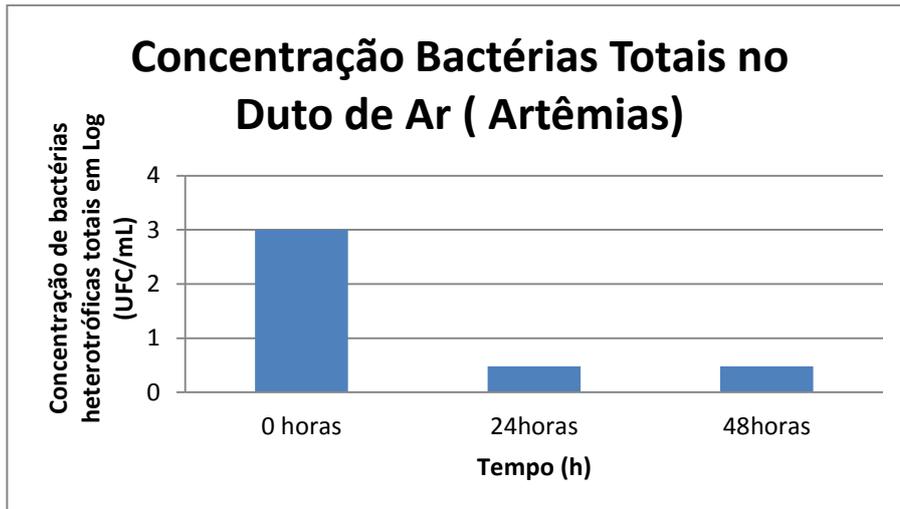


Figura 7: Concentração de Bactérias Totais no Duto de Ar em Log x (UFC/mL)

6.2. MONITORAMENTO DE ÁGUA II

O segundo monitoramento, foi importante para a verificação de outros dados, além da confirmação da eficiência do U.V. e da contaminação que ocorre da água até o U.V. (Figura 8).

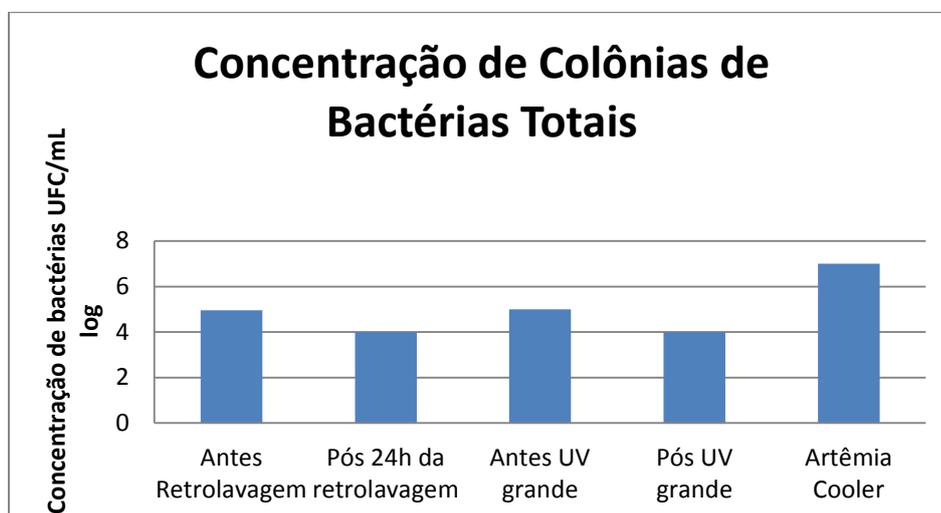


Figura 8: Concentração de bactérias totais em TSA (UFC em log x), em pontos específicos.

Considerando o primeiro e o segundo monitoramento de água, confirmou-se a importância da retrolavagem, a qual pôde ser realizada de 2 a 3 vezes na semana.

No primeiro monitoramento, foi possível certificar a contaminação do Recolast (cisterna) até o U.V., o qual necessitou de uma desinfecção na tubulação de água.

O U.V grande mostrou ser eficiente diminuindo dez vezes a concentração de bactérias totais. Porém, com uma diminuição na concentração de sólidos em suspensão, a sua eficiência poderá ser aumentada.

Já o *cooler* de armazenamento da artêmia recém-eclodida, apresentou uma alta concentração de bactérias heterotróficas totais, inclusive a presença de *Vibrio* crescido em meio TCBS (colocar no gráfico). Dessa forma, recomenda-se a desinfecção da artêmia, evitando a possível e conseqüente contaminação dos peixes.

6.3. CONTAGEM TOTAL DO INÓCULO

A cultura de 500mL contida na garrafa foi plaqueada para realização de uma estimativa da concentração de bactérias ácido-lácticas presentes e confirmação de sua morfologia para sua aspersão segura na ração, antes de ser inoculado na bombona de meio probiótico (tabela1). Foi verificado que a garrafa inoculada com 20mL de bactéria probiótica apresentou crescimento semelhante ao da garrafa inoculada com 40mL em 24 h, apresentado valores de $3,7 \times 10^9$ e $6,8 \times 10^9$ respectivamente. A utilização de metade do meio de cultura para aspersão na ração representou uma grande economia na produção de probiótico na fazenda. Pois as despesas com o meio específico para o crescimento das bactérias ácido-lácticas (MRS) diminuiram.

Tabela 1: Concentração de bactérias ácido-lácticas (UFC) em meio MRS.

Contagem Inóculo garrafa 500mL(MRS)	24h	48h
20ml	3,70E+09	6,80E+09
40ml	3,30E+09	6,40E+09

6.4. CONTAGEM TOTAL DA RAÇÃO

Foi confirmada a colonização das bactérias ácido-lácticas na ração inoculada apresentando valores de 8×10^8 UFC/mL em 48 horas. (Tabela 2) Não foram feitos as análises de Cetrimid e TCBS em 48h. Mudar os meios de cultura para os grupos de bactérias que crescem neles.

Tabela 2: Contagem de bactérias totais (UFC/mL) na ração em diferentes tempos de inoculação.

Contagem ração colonização	Ácido-lácticas	Heterotróficas Totais	<i>Pseudomonas</i>	<i>Vibrio</i>
Contagem na dieta inoculada 24h	1,06E+08	1,00E+08	3,80E+04	-
Contagem na dieta não inoculada 24h	3,80E+06	1,00E+08	1,20E+04	-
Contagem na dieta inoculada 48h	8,00E+08	1,00E+09		
Contagem na dieta não inoculada 48h	3,00E+06	1,00E+09		

Diante dos resultados obtidos, ficou evidente uma possível contaminação da dieta controle, apresentando 3×10^6 UFC/mL. Porém, com a realização do teste Gram, foi certificado que a contaminação não se tratava da bactéria *W. cibaria*, e sim, possivelmente, diferentes gêneros de bactérias ácido-lácticas. (figura 9)

A contaminação pode ter sido originada a partir de diversos componentes da dieta utilizada, como a polpa de peixe, farinha de peixe, entre outros.

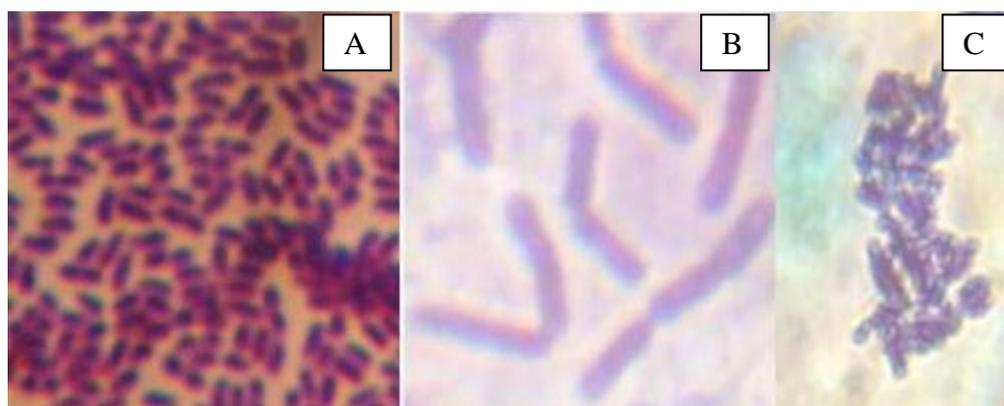


Figura 9: Coloração de Gram das bactérias crescidas em meio de cultura MRS. (A) bactéria crescida dieta inoculada. (B) e (C), bactérias crescidas em dietas não inoculadas.

Na coloração de Gram das bactérias crescidas na dieta não inoculada, constatou-se a presença de pequenos bacilos, bacilocos e colônias de bastonetes alongados. Já, no Gram da dieta inoculada com probiótico, houve uma grande quantidade de *W. cibaria* e outras colônias com características probióticas. As contagens de bactérias heterotróficas totais mantiveram-se semelhantes nos dois tempos de coleta, assim como para bactérias do gênero *Pseudomonas*. Não houve crescimento de *Vibrio* nos meios TCBS.

6.5 CONTAGEM BACTERIOLÓGICA DO TRATO DOS ANIMAIS

A colonização das bactérias probióticas foi verificada e quantificada via contagem bacteriológica das larvas e juvenis do experimento. Na tabela 3, podemos visualizar a contagem inicial e final dos animais em diferentes fases do cultivo em meio TSA Ágar (para bactérias totais) e MRS Ágar (para bactérias ácido lácticas). A colonização do trato dos animais ficou evidente ao final do experimento, tanto nas larvas quanto nos juvenis..

Tabela 3: Contagem inicial e final do trato intestinal das calhas e nos Mini *raceways* (M.RW) em larvas alimentadas com probiótico e não alimentadas com probiótico (algo assim) .

Contagem inicial	Heterotróficas Totais	ácido-lácticas
Calhas	1,00E+04	1,25E+03
Miniraceway	1,00E+04	1,00E+03
Contagem final	TSA	MRS
Calha Controle	1,10E+08	5,50E+07
Calha Probiótico	1,07E+08	2,15E+07
M.RW Controle	7,14E+08	3,14E+07
M.RW Probiótico	9,80E+08	9,16E+08

Nas larvas, a colonização de bactérias ácido-lácticas chegou a $2,15 \times 10^7$ UFC/mL no tratamento com probiótico, quando comparado ao início do experimento de $1,25 \times 10^3$ UFC/mL, onde os animais não receberam suplementação de probiótico (Figura 10).

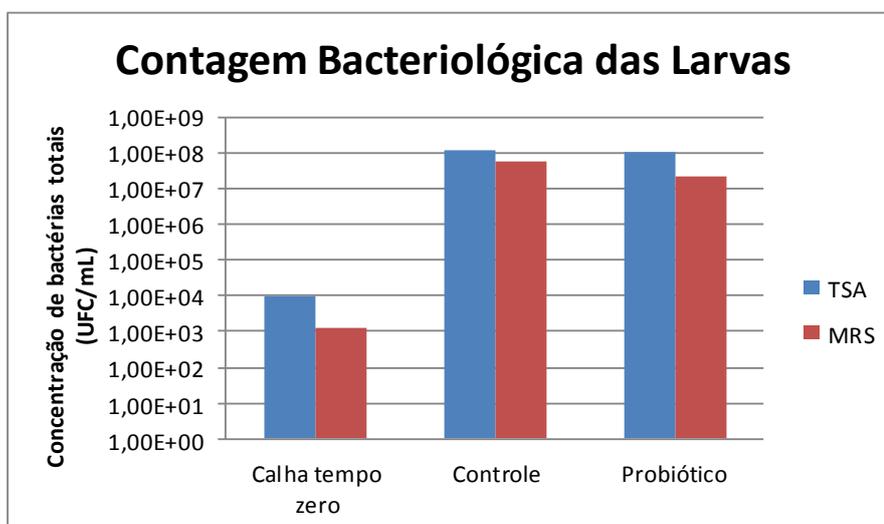


Figura 10: Contagem inicial e final de bactérias totais (TSA) e ácido-lácticas (MRS) no trato das larvas.

O aumento de bactérias heterotróficas totais também foi significativo, passando de 10^4 UFC/mL, no início do tratamento, para $1,07 \times 10^8$ UFC/mL, no final do experimento.

Nos juvenis do mini raceway, também existiu uma colonização de bactérias ácido-lácticas significativa: passando de 10^3 UFC/mL para $9,16 \times 10^8$ UFC/mL. A concentração de bactérias totais também apresentou incremento: passando de 10^4 UFC/mL para $9,8 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 11).

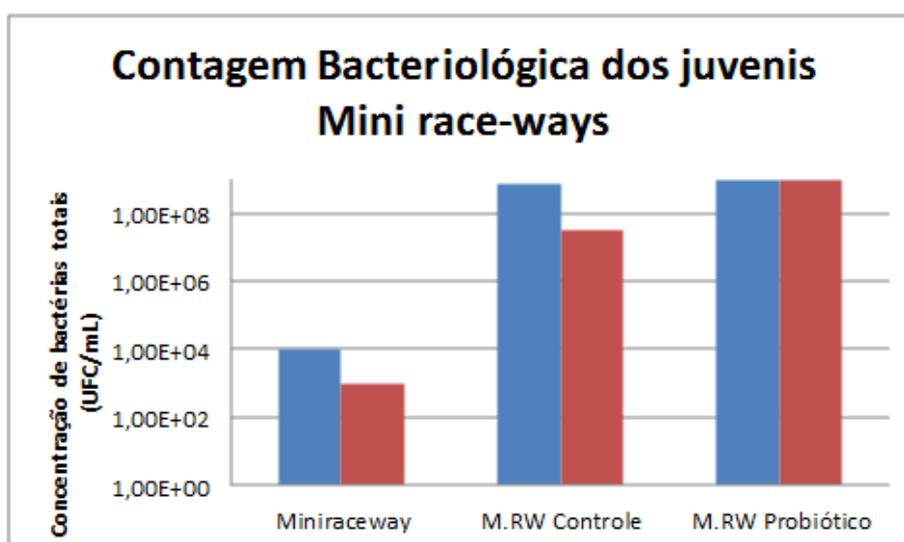


Figura 11: Contagem inicial e final de bactérias totais (TSA) e ácido-lácticas (MRS) de juvenis do mini raceway.

Assim como no ensaio de colonização da ração, os resultados de colonização dos animais apresentaram contaminação nos tratamentos controles. Porém, nos testes Gram realizados, verificou-se bactérias de morfologia e arranjo semelhante a *W. cibarianos* animais tratados com o probiótico. Enquanto que os animais que não receberam a suplementação probiótica, apresentaram bactérias com morfologia e arranjo diferenciados, como pequenos bacilocos, bacilos e bastonetes.

A contaminação pode ter sido oriunda da falta de cuidados por parte dos alimentadores dos animais, devido a não desinfecção das mãos antes do manejo, assim como a não desinfecção das bacias e isopores para o transporte da ração. Outra fonte de contaminação pode ter sido a peletizadora, a qual apresentava uma estrutura fechada e de difícil desinfecção. Esse último pode estar vinculado à contaminação verificada nas contagens bacteriológicas das rações.

A utilização errônea de utensílios (peneira, balde, esponja) em comum a diferentes calhas pode ter ocorrido e, com isso, a consequente e inevitável contaminação entre os tratamentos.

6.6. GANHO EM PESO E SOBREVIVÊNCIA NA LARVICULTURA

Os animais alimentados com probiótico obtiveram um aumento de $17,72 \pm 2,20$ g, enquanto os animais não suplementados obtiveram um incremento de $23,38 \pm 8,5$ g no final do sétimo dia (Figura 12). Embora não se trate de uma diferença significativa ($p=0,26$), é importante ressaltar a maior homogeneidade do lote (menor desvio padrão) do tratamento probiótico. Também observado nos experimentos em laboratório (mourino, 2010)

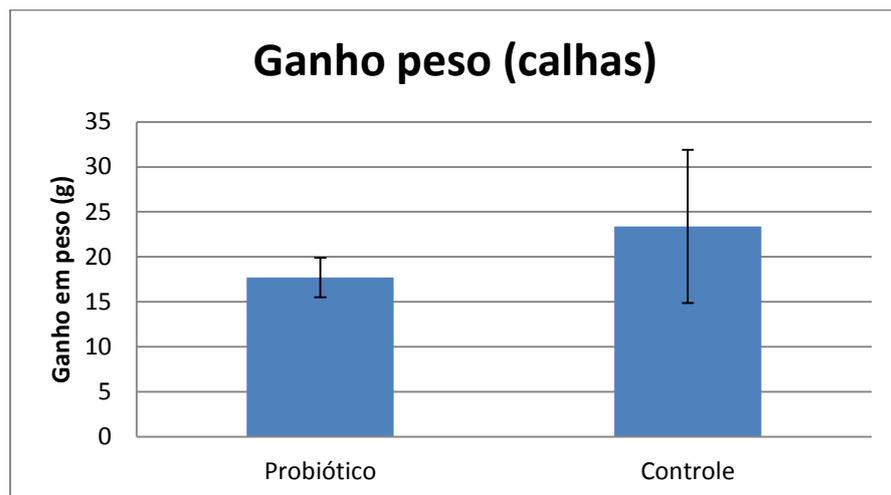


Figura 12: Ganho em peso dos animais suplementados e não suplementados com probiótico.

Esse aumento na homogeneidade das larvas permite um crescimento mais padronizado, com menor mão de obra para seleção, maior previsibilidade de manejo, a maior possibilidade de que todas as larvas alimentem-se por igual e, conseqüentemente, uma menor taxa de canibalismo.

O mesmo foi observado no gráfico de mortalidade, em que as larvas alimentadas com probiótico apresentaram um total de $183,3 \pm 74,15$ larvas mortas, enquanto que as sem suplementação de probiótico apresentaram cerca de $266,8 \pm 144,97$ larvas mortas ($p=0,08$) (Figura 13).

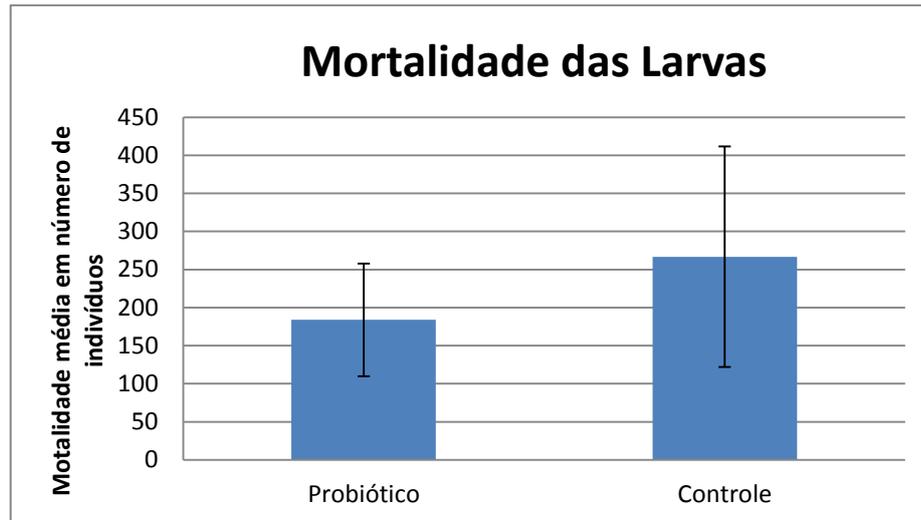


Figura 13: Mortalidade total das larvas nas calhas entre os dois tratamentos. $P=0,08$

O gráfico de mortalidade acumulativa (Figura 13), apresenta uma menor inclinação da reta do tratamento probiótico, o que garantiu maior sobrevivência das larvas suplementadas.

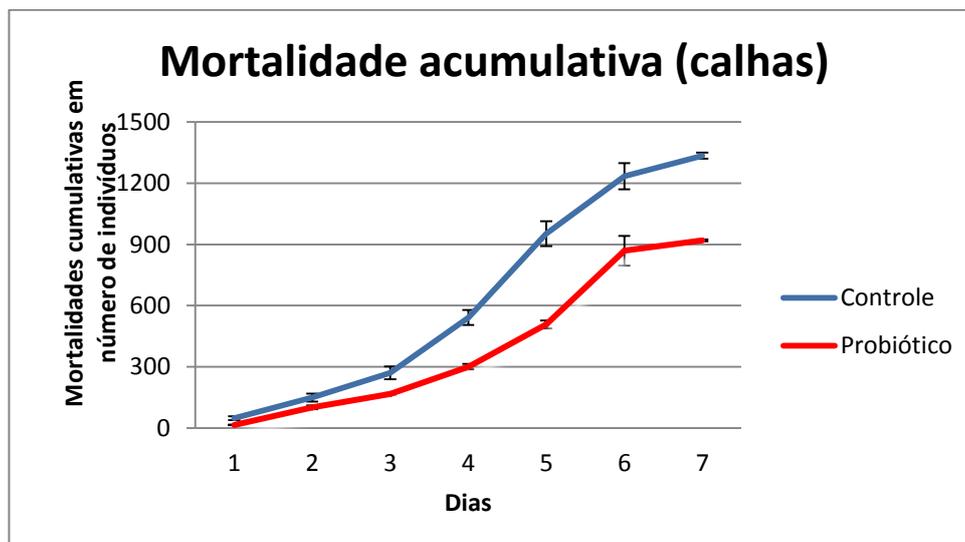


Figura 14: Mortalidade acumulativa na larvicultura.

6.7. GANHO EM PESO E SOBREVIVÊNCIA DE JUVENIS EM MINI RACEWAYS.

Os dados de ganho em peso dos juvenis em mini *raceways* não apresentaram veracidade devido à necessidade de seleção dos animais por tamanho durante a produção. Essa seleção acarretou em uma mistura entre os animais alimentados

com probiótico e os animais não alimentados com probiótico. Dessa forma, os dados não serão utilizados.

Quanto a mortalidade média (Figura 15), foi possível avaliar a sobrevivência dos animais ao longo de 4 dias, onde os animais tratados com probiótico apresentaram uma mortalidade de $11 \pm 6,39$ peixes, enquanto que o controle teve uma mortalidade de $59 \pm 30,53$ peixes.

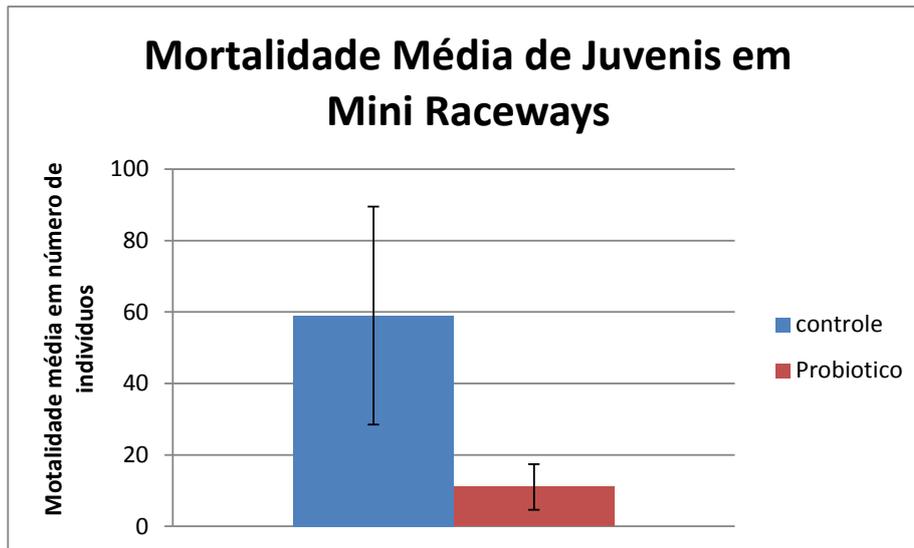


Figura 15: Mortalidade média de juvenis em *miniraceways* alimentados ou não com probiótico.

A mortalidade cumulativa dos peixes suplementados com probiótico mostrou-se muito menor quando comparada à mortalidade do controle. Podemos verificar uma crescente mortalidade nos animais não suplementados com o probiótico, enquanto que a linha de mortalidade dos animais suplementados manteve-se em constância (Figura 16).

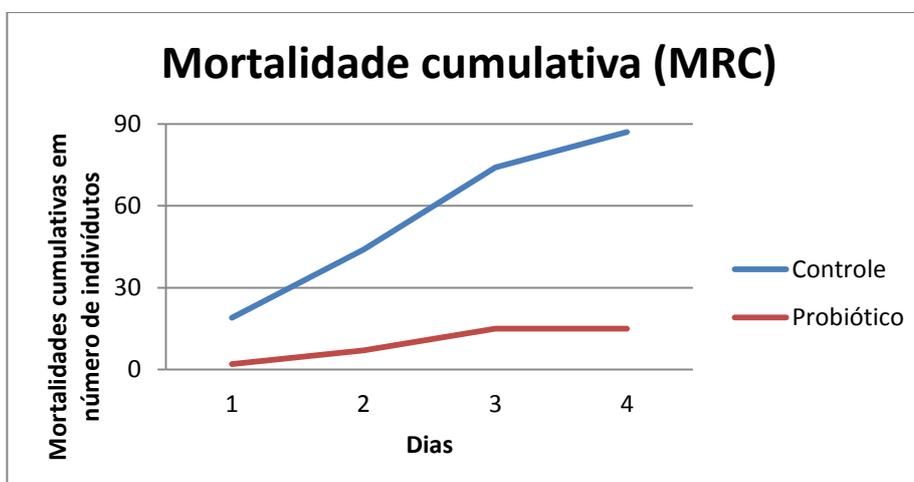


Figura 16: Mortalidade cumulativa de juvenis em mini raceways alimentados ou não com probiótico.

É válido destacar a maior homogeneidade dos animais suplementados com probiótico nos mini *raceways*. Embora o experimento tenha sido de curta duração, o desvio padrão mostrou-se menor quando comparado ao tratamento.

Os dados estatístico no sistema de *raceways* não foram realizados devido a ausência de repetições. Porém é importante considerar essas diferenças como base nos demais sistemas de produções, verificando se as mesmas se apresentam de maneira semelhantes

6.8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo, verificamos uma possível eficiência da utilização de probiótico como suplemento alimentar de surubins híbridos.

Novos experimentos podem ser realizados, aumentando o período de duração, o número de repetições, as vias de fornecimento do probiótico e a utilização de aditivos ou técnicas complementares ao mesmo. Um exemplo de técnica seria a vacinação, a qual poderia ser potencializada devido ao estado de “boa saúde” garantido pelo probiótico. Enquanto que um importante aditivo seria o uso de ácidos orgânicos, que estariam complementando a eficiência dos probióticos na inibição de bactérias patogênicas oportunistas.

A inoculação via artêmia seria uma forma de encapsular o probiótico, garantindo sua chegada ao trato intestinal do animal. Outro fator importante seria a diminuição da concentração total de *Vibrio* na artêmia, através de competição e produção de compostos antimicrobianos.

Projetos de produção massiva de probiótico e vacinação para atender a total demanda da fazenda estão em andamento, buscando maior produtividade através do cultivo de animais mais resistentes a infecções de origem bacteriana.

O monitoramento microbiológico deve continuar sendo utilizado como ferramenta fundamental nas tomadas de decisões no cultivo e padronização de manejo. É através do mesmo que visualizamos, de maneira concreta, o que está acontecendo com as larvas e a água do cultivo no presente momento. Além disso, é uma forma dos funcionários, principal mão de obra na fazenda, se conscientizarem e entenderem a importância da manutenção de um cultivo limpo e organizado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOYD, C. E. e MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquaculture**, v.20, p.13-132. 1999.

CAMPAGNOLO R. e NUÑER A. P. O. Sobrevivência e crescimento de larvas de surubim, *Pseudoplatystomacorruscans* (Pisces, Pimelodidae), em diferentes densidades de estocagem. **Acta SciAnimSci**, v.28, p.231-237, 2006.

CREPALDI. D.V. O surubim na aquacultura do Brasil. **Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte**, v.30, n.3/4, p.150-158, jul./dez. 2006.

Merrifield, D.L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, **302** (2010) 1-18.

FAO, Figis - **Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service**-29/06/2011.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147–165, 1999.

INOUE I., CECCARELLI, P. S. e SENHORINI, J. A. A larvicultura e a alevinagem do Pintado e do Cachara. **Panor Aquicult**, v.74, p.13-21, 2002.

KARUNASAGAR, I. et al. Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. **Aquaculture**, v.268, p.288–292, 2007.

KLAENHAMMER, T.D. e KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **Internacional Journal Food Microbiology**, v.50, p.45–57, 1999.

KUBITZA F., CAMPOS, J. L. e BRUM, J. A. Surubim: produção intensiva no Projeto Pacu Ltda. e Agropeixe Ltda. **Panor Aquicult**, v.49, p.25-32, 1998.

MAKRIDIS, P.; COSTA, R. A. e DINIS, M. T. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima* and effect on bacterial load of enriched *Artemia* metanauplii. **Aquaculture**, v.255,p.76–81, 2006.

MORIARTY, D. J. W. Control of luminous *Vibrio* sp. in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.164, p.351-358, 1998.

MOURIÑO, J. L. et al. **Suplementação dietética com simbiótico para o híbrido de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* e cachara (*P. Fasciatum*)).** Tese de Pós Graduação UFSC, 124p.,2010.

MOURIÑO, J. L. et al. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hibrid surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). **Aquaculture nutrition**, p.8, 2011.

SAPKOTA, A. et al. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, v.34, n.8, p.1215-1226, 2008.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, et al,(Orgs), **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Florianópolis, Multitarefa Editora Ltda, p. 337-368, 2003.