

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

RECUPERAÇÃO DE CEPAS DE *Vibrio parahaemolyticus*
INOCULADAS EM CAMARÃO MARINHO, *Litopenaeus*
vannamei, SUBMETIDAS ÀS TEMPERATURAS DE
RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

DANNIELLE BATISTA ROLIM SOUSA

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
ABRIL/2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RECUPERAÇÃO DE CEPAS DE *Vibrio parahaemolyticus*
INOCULADAS EM CAMARÃO MARINHO, *Litopenaeus*
vannamei, SUBMETIDAS ÀS TEMPERATURAS DE
RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

DANNIELLE BATISTA ROLIM SOUSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PESCA

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
ABRIL/2007

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho dessa dissertação será permitida, desde que seja conforme as normas científicas.

Danielle Batista Rolim Sousa

Dissertação aprovada em 13/04/07

Profª Dra. REGINE HELENA SILVA DOS FERNANDES VIEIRA
Orientadora

Profª Dra. SILVANA SAKER SAMPAIO
Membro

Prof. Dr. ANDREW MACRAE
Membro

Monólogo do *Vibrio parahaemolyticus*

De tão pequenininho que sou
Vivo sem ser avistado.
Se quero, me multiplico.
Sou mil faces num espelho.
No calor eu sou o tal.
Mas se o frio é meu leito
Me amedronto, desapareço,
Morro e encolho no sal.

Sou muito pequenininho
Mas faço muitas loucuras.
No pescado causo dor
E no homem dissabor.
O frio é meu inimigo
E o calor me faz bonito.
Portanto se não me querem
No gelo vão me deitar.
Aconteço na terra
mas minha casa é o mar.

Regine Limaverde

À minha querida mãe Darticléa, a quem muito admiro. Agradeço todo o incentivo durante estes anos e a compreensão por entender minha ausência. Esta é minha verdadeira companheira. Nunca vou poder agradecê-la o bastante.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem atribuo toda minha força e sabedoria.

As minhas companheiras de labuta: Gleire, Anahy, Cristiane, Rakel, Rosa, Karla, Edirsana, Cláudia, Norma, Oscarina e Fran.

À Camila, minha pupila, por toda sua dedicação.

Às eternas Reginetes: Elenice, Leyla, Regina, Hilda, Flávia, Ana Márcia, Suzy, Waleska, Isabel, Hilda, Luana e Carol.

Aos agregados do laboratório: Gardenny, Janisi e Buda.

Aos novos membros do laboratório: Fábio Roger, Régis, Carlos, Giuseppe e João.

Aos meus colegas de mestrado: Erivânia, Rodrigo, Marcília, Cícero, Vinícius, Ianna, Jullyermes, Sara, Ariévilo, Carlos Henrique, Babe, Hélio e Luis Henrique.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o curso.

Ao LABOMAR pelo uso de suas instalações.

À FIOCRUZ por me ceder o material essencial ao meu trabalho.

Aos professores do Curso de Mestrado da UFC, por suas disponibilidades em me ajudar sempre, em especial a Professora Silvana.

A todas as pessoas, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha orientadora Regine Vieira, a quem devo a oportunidade de ingresso no laboratório, o aprendizado contínuo, a credibilidade em mim e o meu crescimento científico.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Camarão marinho, <i>Litopenaeus vannamei</i>	8
1.1.1 Importância econômica do camarão, <i>Litopenaeus vannamei</i> , para a região Nordeste	9
1.2 <i>Vibrio</i> sp.	10
1.2.1 Taxonomia	10
1.3 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11
1.3.1 Habitat.....	12
1.3.2 Patogenicidade ao homem	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Matéria-prima.....	16
2.1.1 Camarão	16
2.1.2 Cepa de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> usada na infecção dos camarões.....	17
2.1.3 Tratamento da cepa	17
2.1.4 Experimento piloto	17
2.1.5 Tratamento dos camarões	20
2.1.6 Contaminação dos camarões	20
2.1.7 Resistência de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> em temperatura de caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer	23
2.1.7.1 Preparação do homogenato e inoculação das placas de plate count ágar e de ágar tiosulfato citrato-bile-sacarose	23
2.1.8 Análise estatística	25
2.1.8.1 Comparação da eficiência dos tratamentos na redução da UFC/g.....	25

2.1.8.2 Comparação da taxa relativa de redução da UFC/g em função do tempo de atuação dos tratamentos	28
2.1.8.3 Estimação do valor do intervalo de tempo necessário para anular a contaminação por <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4. CONCLUSÃO.....	44
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	45

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo recuperar *Vibrio parahaemolyticus*, inoculado em homogenato de camarão marinho, *Litopenaeus vannamei* livre de víbrios, submetido a diferentes temperaturas de refrigeração (caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer) por dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias. Foram realizadas seis repetições do experimento, no período de outubro de 2005 a março de 2006. O camarão foi adquirido na feira de pescadao da Praia do Mucuripe, Fortaleza-Ceará. Em laboratório, 1.500 g de camarão eram lavados com água destilada e imersos em água fervente por cinco minutos para eliminar qualquer *Vibrio* presente na amostra. A contaminação do camarão era feita mediante o contacto dos animais com a cultura de *V. parahaemolyticus*, por cinco minutos. A amostra era dividida em 40 frações de 25 g sendo uma delas usada para contagem no tempo zero e as restantes divididas em três lotes sendo estocadas em três temperaturas: caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C). Por dez dias seguidos, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias, *V. parahaemolyticus* eram quantificados nos camarões através do Método de Contagem Padrão em Placas, em meios de TCBS e PCA. Todas as três temperaturas foram eficientes no controle da viabilidade de *V. parahaemolyticus*. A ação do frio gerado por gelo, geladeira e freezer inibe o crescimento dessa bactéria em camarões, sendo a temperatura do freezer, a mais eficiente na redução dessa espécie bacteriana em camarões.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in meat homogenate of shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures of refrigeration (refrigerator, freezer and isothermic box with ice) during ten days and on the 15th, 20th and 25th days. The experiment was repeated six times during October 2005 to March 2006. Shrimps were obtained on fish market located at Praia do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. In the laboratory, the shrimps were washed with distilled water and from immersed in boiling water for five minutes in order to eliminate any other *Vibrio* the sample. The sample inoculation happened with the contact between the shrimps and the *V. parahaemolyticus* culture during five minutes. Then, the sample was divided in 40 portions with 25 g each. One of the portions was used as zero time. The other 39 portions were separated in 3 batches and maintained on freezer (-21°C), refrigerator (11°C) and isothermic box with ice (-1°C to 13°C). The number of *V. parahaemolyticus* was monitored for 10 days and on 15th, 20th and 25th days by the plate count method on TCBS and PCA media. All temperatures were efficient to control the viable cells of *V. parahaemolyticus*. The action of cold produced by ice, refrigerator and freezer inhibit the bacterial growth on shrimps. The freezer was the most efficient treatment to reduce the *V. parahaemolyticus* on shrimp samples.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Esquema da contaminação dos camarões e determinação do tempo ideal para eliminação das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* inoculadas nos camarões *Litopenaeus vannamei* – Experimento Piloto 19
- FIGURA 2** – Esquema para contaminação dos camarões com *Vibrio parahaemolyticus* quantificação do inóculo inicial e preparação dos lotes para armazenagem nas três diferentes temperaturas (-1 a 13°C, 11°C e -21°C)..... 22
- FIGURA 3** – Esquema para quantificação de *Vibrio parahaemolyticus* em meio ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) e plate count ágar (PCA) dos lotes de armazenagem nas três diferentes temperaturas pelo Método de Contagem Padrão em Placas (CPP) 24
- FIGURA 4** – Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em ágar tiosulfato citrato-bile sacarose, a partir do homogenato preparado com camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados em diferentes temperaturas (-1 a 13°C(a), 11°C(b) e -21°C(c)) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias 32
- FIGURA 5** – Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em plate count ágar, a partir do homogenato preparado com camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados em diferentes temperaturas (-1 a 13°C(a), 11°C(b) e -21°C(c)) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias 38

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** – Resultados logaritmizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/g) em ágar tiosulfato citrato-bile sacarose preparado com camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados às temperaturas de caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias..... 31
- TABELA 2** – Resultados logaritmizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/g) em plate count ágar a partir do homogenato preparado com camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados às temperaturas de caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias..... 37
- TABELA 3** – Resultados obtidos com o teste de Dunn, para as comparações da eficiência, duas a duas, entre os tratamentos caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer, na eliminação do *Vibrio parahaemolyticus* de camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados em diferentes temperaturas..... 41
- TABELA 4** – Resultados obtidos com o teste t, para as comparações, duas a duas, da taxa de decréscimo (b) da UFC/g de *Vibrio parahaemolyticus* inoculados em camarões, *Litopenaeus vannamei*, em função do tempo, entre os tratamentos caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer, para a condição TCBS 42

RECUPERAÇÃO DE CEPAS DE *Vibrio parahaemolyticus* INOCULADAS EM CAMARÃO MARINHO, *Litopenaeus vannamei*, SUBMETIDAS ÀS TEMPERATURAS DE RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

1. INTRODUÇÃO

A oferta mundial de pescado aumentou de 27,6 milhões de toneladas, em 1961, para mais de 93 milhões de toneladas até o final do século 20. O consumo médio aparente aumentou, de cerca de 9 kg per capita/ano, no começo dos anos 60, para cerca de 16 kg em 1997, com tendência de aumento (FAO, 2004).

No Brasil, as regiões Norte e Nordeste contribuem com 40% da produção pesqueira marinha, sendo apenas 5% provenientes da produção industrial. A produção de pesca artesanal não tem registros estatísticos confiáveis mas, possivelmente emprega em torno de 30.000 pescadores e contribui com mais da metade da captura marinha brasileira (CASTELLO, 2003).

De maneira similar à Região Norte, a produção de pescado estuarino/marinho no nordeste brasileiro é majoritariamente oriunda da pesca artesanal (75% das capturas regionais) (PROFROTA, 2003).

Por ser um alimento rico em nutrientes, principalmente proteínas, o pescado é bastante susceptível ao ataque e/ou ao desenvolvimento

microbiano, além de poder sofrer alterações de natureza física ou química, que irão refletir em sua cor, consistência, odor e sabor, podendo, além de acarretar perdas do produto, ocasionar riscos à saúde dos consumidores (SOUSA, 2003). Daí, para se ingerir um pescado há necessidade de que se tenha certeza da inocuidade deste para que o consumidor não adoça.

Assim, as doenças transmitidas por alimento são denominadas DTA's. Mais de 250 doenças são descritas nesse grupo, havendo uma variedade de agentes etiológicos, tais como: biológicos, físicos e químicos (SILLOS; FAGUNDES NETO, 2004).

Estima-se que, em 2002, somente no Estado de São Paulo, cerca de 1,5 milhões de pessoas apresentaram alguma DTA. Entretanto, apenas 3.950 casos foram registrados, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (SILLOS; FAGUNDES NETO, 2004). O pescado é um dos alimentos que pode causar inúmeros distúrbios ao consumidor.

No México, estudos epidemiológicos têm mostrado que a população que mora em estados litorâneos possui maior susceptibilidade em contrair doenças de origem marinha, incluindo as provocadas pelo gênero *Vibrio* (PARVEEN et al., 2003).

O camarão marinho é um importante recurso pesqueiro encontrado em todos os mares do mundo, desde regiões de latitude subpolar até regiões subtropicais, onde sua incidência é maior. Nos trópicos são encontradas espécies de alto valor econômico, com áreas de pesca de grande produtividade e produção (MACHADO, 1988; LAVILLA-PITOGO et al., 1998). Uma das

espécies de camarão de grande valor comercial, natural do Oceano Pacífico, e que foi adaptada no Brasil é a *Litopenaeus vannamei* (MARTINS, 2003).

A necessidade de um conhecimento básico sobre a avaliação da qualidade desse camarão cultivado, e seu armazenamento sob refrigeração após a colheita, aumentou com a ascensão na aquicultura e a comercialização da espécie (LALITHA; SURENDRAN, 2006).

Existem patógenos que podem causar problemas no cultivo do camarão, levando os animais até a morte, e os que causam problemas ao consumidor pela ingestão do pescado contaminado. *V. parahaemolyticus* é um desses patógenos. Apesar de viver no meio aquático normalmente, com variações de NaCl de 1 a 3%, ele pode causar duplo problema: ao animal e ao consumidor (LIGHTNER, 1993; SEM et al., 2007). Muitos vibrios podem ser agentes causais de bacterioses porque compõem a microbiota dominante nos estágios de desenvolvimento larval dos camarões, sendo também isolados de animais saudáveis. Esse fato comprovaria a característica oportunista desses microrganismos associados aos camarões (MENEZES, 2005).

De acordo com Barbieri et al. (1999), os ambientes estuarinos e de água doce são reservatórios críticos para espécies do gênero *Vibrio*, causadores de doenças. Gomez-Gil et al. (2004) citam que essas bactérias são um dos patógenos infectantes mais importantes de organismos aquáticos, tais como camarões peneídeos, várias espécies de peixes, moluscos e corais.

No cultivo de camarão os vibrios e a maioria de outros patógenos bacterianos são Gram-negativos enquanto que nas águas usadas para o

cultivo de peixes as bactérias tendem a ser predominantemente Gram-positivas (YAP, 2001).

A ecologia dos víbrios nos sistemas aquáticos tem sido bem estudada; a distribuição das espécies é afetada pela salinidade, disponibilidade de nutrientes e temperatura, dentre outros parâmetros. Nos estudos ecológicos, a incidência de víbrios halofílicos é considerada alta em amostras de água e de alimentos marinhos (WONG et al., 1992; THOMPSON et al., 2004).

Panicker et al. (2004) afirmam que dentre as várias espécies pertencentes ao gênero *Vibrio*, autóctones de ambientes marinhos e estuarinos, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* são as principais causadoras de gastroenterite no homem e em alguns casos, septicemia. Hayat et al. (2006) alertam para o risco que o consumo de alimentos de origem marinha pode representar para a saúde pública, uma vez que cepas de *V. parahaemolyticus* toxigênicas (O3: K6) têm sido isoladas dessas fontes, apresentando potencial para provocar pandemias.

Dentre as espécies do gênero *Vibrio*, *V. parahaemolyticus* é de suma importância à saúde pública devido ao seu potencial enteropatogênico sendo causador de gastroenterite aguda no homem, caracterizada por quadro disentérico, principalmente, após o consumo de pescado *in natura* (LIMA, 1997).

A identificação de *V. parahaemolyticus* como um agente da gastroenterite de origem alimentar foi feita, inicialmente, por Fujino em 1951 (FUJINO et al., 1974). O primeiro surto dessa bactéria, nos EUA, aconteceu em 1971 (MOLENDÁ et al., 1972). Os alimentos envolvidos foram caranguejos cozidos

no vapor e salada de caranguejos e, das 745 pessoas expostas, 425 ficaram doentes.

Microrganismos possuem uma grande adaptabilidade aos seus ambientes fisiológicos. Toda mudança extrema das condições ambientais resulta em estresse para os microrganismos e o grau dessas mudanças determinará se ele irá morrer ou reduzir a sua taxa de crescimento (RAY, 1986; RUSSELL et al., 1995). Entretanto, tais respostas ao estresse podem desempenhar um importante papel na sobrevivência dos organismos em um determinado produto, afetando assim sua vida de prateleira. Alterações nas condições do meio ambiente, modificando as condições ótimas para os microrganismos, podem causar uma indução de muitas respostas ao estresse. Essas estratégias são direcionadas em geral a uma melhor sobrevivência dos microrganismos que ao crescimento. Dados sobre as respostas ao estresse dos microrganismos, após a redução de sua temperatura, irão ajudar à indústria alimentícia a entender seus comportamentos nos produtos e como prolongar o efeito do estresse na pré-estocagem. Diferentes tratamentos de choque após o congelamento ou resfriamento podem resultar em diferenças na sobrevivência e no crescimento microbiano. Um bom entendimento do mecanismo de adaptação ao resfriamento pode oferecer uma melhor compreensão sobre os métodos para controle de crescimento de microrganismos psicrófilos em alimentos resfriados ou congelados (BEALES, 2004).

A maioria das bactérias é capaz de tolerar pequenas mudanças nos parâmetros ambientais (HILL et al., 1995). Essa tolerância é conseguida

através de adaptações fisiológicas, e de mecanismos de resistência desenvolvidos para garantir a sobrevivência (HERBERT, 1989).

Geralmente o pescado é comercializado cru ou congelado porque é o processamento menos dispendioso. Este procedimento faz com que o consumidor prepare seu pescado da forma como desejar. Poucas indústrias brasileiras enlatam o pescado, fato mais observado no Sul do Brasil, com sardinhas e atuns. O Nordeste comercializa o pescado filetado ou inteiro, congelado (VIEIRA, 2004).

A refrigeração continua a ser um dos mais efetivos meios de prolongar a vida útil de alimentos frescos ou processados, devido à redução na taxa de crescimento dos microrganismos (RUSSELL, 2002). Baixas temperaturas são usadas para retardar as reações químicas por inativação das enzimas do alimento e/ou minimizar ou parar a atividade dos microrganismos no alimento. Cada microrganismo apresenta uma temperatura ótima e outra mínima para seu crescimento, abaixo da qual não terá condições para se multiplicar. Temperaturas de resfriamento envolvem gelo ou refrigeração mecânica. Alimentos perecíveis, tais como pescados, podem ser estocados em gelo por um tempo limitado, com ligeiras mudanças de suas condições iniciais. Apesar de não evitar o desenvolvimento de microrganismos, o gelo poderá retardar a ação desses deterioradores (FRAZIER; WESTHOFF, 1988).

Quando gelo é empregado de maneira correta e em quantidade adequada, contribui para a conservação do pescado reduzindo sua temperatura até 0 a 2°C, havendo então um atraso nas alterações enzimáticas e bacterianas (STANSBY, 1968).

A temperatura de estocagem é um dos parâmetros mais importantes para regulação da atividade dos microrganismos nos sistemas alimentares. Devido ao impacto da temperatura em todas as reações da célula, a adaptação dos microrganismos a variações de temperatura é, possivelmente, o tipo de reação mais pesquisado (PALUMBO, 1986; GOUNOT, 1991; BERRY; FOEGEDING, 1997). Porém, a sensibilidade das células ao estresse causado pelo frio é dependente de vários fatores incluindo a temperatura, taxa de resfriamento/congelamento, meio de cultura, cepa e duração de estocagem.

Alguns autores relatam que, ao contrário do que se pensa, o pescado das regiões tropicais, por apresentar uma microbiota predominantemente mesófila, tem um período de estocagem em gelo, mais longo do que os capturados em águas frias ou temperadas. A microbiota mesófila é pouco adaptada à multiplicação em temperaturas de refrigeração e teria uma menor produção de compostos de degradação e uma atividade metabólica diferente da psicrófila (DISNEY, 1976).

1.1 Camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*

L. vannamei é uma espécie encontrada naturalmente desde a parte leste do Oceano Pacífico, a altura de Sorona, no México, até Thumbes, norte do Peru. É uma espécie marinha, com preferência por fundo de lama, encontrada desde a região do infralitoral, até a profundidade de 72 metros e na natureza pode chegar a 23 cm de comprimento. É a espécie comercial mais explorada

no sul do México, Guatemala e El Salvador e a mais cultivada no Hemisfério Ocidental (BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002).

L. vannamei é um crustáceo decápodo, pertencente à família Penaeidae (HUNER; BROWN, 1985). Segundo Dall et al. (1999), os membros dessa família apresentam um ciclo de vida semelhante, com desenvolvimento de estágios: larvar (náuplio), protozoos, misis, pós-larvar, juvenil e adulto. As diferenças estão relacionadas com a preferência das pós-larvas, juvenis e adultos por determinadas áreas durante seu ciclo de desenvolvimento.

Nas fases iniciais de desenvolvimento, o camarão marinho habita regiões com águas de características oceânicas, mas refugia-se em ambientes próximos ao litoral na medida em que cresce. Estuários ou outros habitats costeiros servem de berçários naturais para pós-larvas e camarões juvenis. Esses ecossistemas são freqüentemente expostos a repentinas mudanças na salinidade da água, como resultado de influência de marés e rios, da evaporação ou de chuvas. Ainda no estágio juvenil, *L. vannamei* migra para alto mar à procura de águas com profundidade de até 70 metros. No ambiente natural a mudança de habitat tem uma finalidade única, incrementar as chances de sobrevivência da prole (NUNES, 2001).

De acordo com Valença e Mendes (2003), *L. vannamei* é conhecido como potente osmorregulador, podendo habitar desde águas com salinidade superiores a 40‰ até águas com salinidades muito próximas a zero. Essa tolerância está relacionada com o ciclo de vida migratório desses camarões, cuja reprodução ocorre no oceano, sendo as larvas levadas pelas correntes marinhas para dentro dos estuários e das baías. Durante a migração, as larvas

passam por mudanças morfológicas e fisiológicas necessárias à sua adaptação aos estuários. Nesse ambiente, o camarão se encontra na fase de pós-larva diferenciando-se da fase juvenil apenas pelo número de dentes rostrais e proporções do corpo.

1.1.1 Importância econômica do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, para a região Nordeste

A importância econômica dos cultivos de camarões marinhos é cada vez maior em muitos países costeiros subdesenvolvidos. Para um país tropical se tornar um produtor é preciso que as condições ambientais dos ecossistemas estuarinos sejam propícias. No Brasil, do sul da Bahia ao norte do Maranhão há condições excelentes para a implantação e desenvolvimento de camarões confinados (SCHOBER, 2002).

No Brasil, observa-se uma tendência semelhante ao que aconteceu em outros países, como China, Tailândia, Vietnã, Índia, Indonésia e Bangladesh, que hoje dominam o mercado mundial da carcinicultura. O clima favorável do Brasil, somado ao domínio das novas tecnologias de produção, colocam o País como o principal produtor de camarões das Américas. Entre 1997 e 2001, a produção de camarões marinhos cultivados no Brasil cresceu a uma taxa anual de 83%, passando de 3.600 toneladas para 40.000 toneladas/ano no final de 2001. Entre 2002 e 2003, a produção de camarões cultivados apresentou um crescimento anual de 50%, alcançando valores superiores a 90.000 toneladas/ano (ABCC, 2004).

O Ceará, no ano de 2004, foi o segundo maior produtor de camarão do País, atingindo a cifra de 65 milhões de dólares somente com a sua exportação, atrás apenas do Rio Grande do Norte. Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior (MDIC), no mesmo ano, o estado do Ceará apresentou um crescimento em exportação de 10% sobre o ano de 2003 (EUGÊNIO, 2005).

1.2 *Vibrio sp*

1.2.1 Taxonomia

Os gêneros *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas* formam o segundo principal grupo de bacilos Gram-negativos, fermentativos, anaeróbios facultativos, isto é, crescem em condições aeróbias e anaeróbias. Antigamente esses microrganismos eram classificados juntos na família Vibrionaceae e foram separados das Enterobacteriaceae por apresentarem reação oxidase-positiva e pela presença de flagelos polares. Esses microrganismos foram também classificados juntos, não só por serem encontrados principalmente na água, mas também por serem capazes de causar doença gastrointestinal. Entretanto as técnicas de biologia molecular estabeleceram que esses gêneros possuem apenas uma relação distante e pertencem a três famílias distintas. *Vibrio* e *Aeromonas* são agora classificadas nas famílias Vibrionaceae e Aeromonadaceae, respectivamente. *Plesiomonas* são intimamente relacionadas ao *Proteus* e foram colocadas na família Enterobacteriaceae (MURRAY et al., 2004).

O gênero *Vibrio* consiste em pelo menos 79 espécies (DSMZ, 2007) e três delas estão freqüentemente associadas com *V. parahaemolyticus* em ambientes aquáticos e produtos do mar: *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* e *V. cholerae* (JAY, 2005).

Os microrganismos aquáticos pertencentes ao gênero *Vibrio* são definidos como bastonetes retos ou curvos, móveis, Gram-negativos e não-esporogênicos. A maioria desses microrganismos é fermentador de glicose sem produção de gás e apresentam reação de oxidase positiva em quase todas as espécies. Algumas espécies de *Vibrio* são identificadas como patogênicas ao homem, como por exemplo, *V. cholerae*, agente causador da cólera, também *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, responsáveis por muitos casos fatais relacionados à ingestão de frutos do mar contaminados (SILVA et al., 1997; THOMPSON et al., 2004).

1.3 *Vibrio parahaemolyticus*

A maioria das doenças de origem alimentar é veiculada por diferentes tipos de alimentos enquanto que, a gastroenterite produzida por *V. parahaemolyticus* é contraída, quase que somente, através de frutos do mar. Quando outros alimentos estão envolvidos, estes foram infectados por frutos do mar através de contaminação cruzada. Outra característica única dessa doença é o habitat natural do agente etiológico: o mar. Além do seu papel na gastroenterite, *V. parahaemolyticus* é conhecido como agente causador de infecções fora do intestino humano (JAY, 2005).

V. parahaemolyticus pode crescer na presença de 1 a 8% de cloreto de sódio (NaCl), com um crescimento ótimo na faixa de 2 a 4% (SAKAZAKI, 1979) e não sobrevive em água destilada. Não cresce a 4°C, mas seu crescimento foi demonstrado entre 5°C e 9°C, pH 7,2 a 7,3 a 3% de NaCl ou a pH 7,6 a 7% de NaCl. Seu crescimento em alimentos foi demonstrado a 9,5°C a 10°C, contudo, em águas abertas, o mínimo para o crescimento foi de 10°C. A sua temperatura máxima de crescimento é de 44°C, com uma temperatura ótima entre 30°C e 35°C. Também foi observado crescimento em uma faixa de pH entre 4,8 e 11,0 sendo a faixa ótima de 7,6 a 8,6. O pH mínimo está relacionado com a temperatura e o conteúdo de NaCl. Um crescimento moderado de uma linhagem foi observado em pH 4,8 quando a temperatura estava a 30°C e a concentração de NaCl de 3%, contudo, o pH mínimo foi de 5,2 com a concentração de 7% de NaCl (BEUCHAT, 1973).

1.3.1 Habitat

As espécies de *Vibrio* crescem naturalmente em estuários e ambientes marinhos no mundo inteiro. Todas as espécies de *Vibrio* são capazes de sobreviver e se multiplicar em águas contaminadas com elevada salinidade e temperatura variando de 10°C a 30°C. Os vibriões patogênicos também podem crescer em águas com moluscos quitinosos, daí a associação entre as infecções por *Vibrio* e o consumo de mariscos (MURRAY et al., 2004).

As infecções causadas por *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e outros vibriões patogênicos resultam do consumo de frutos do mar inadequadamente cozidos, particularmente ostras, ou da exposição à água do mar contaminada.

A gastroenterite causada pelos vibriões ocorre durante todo o ano, uma vez que os organismos são tipicamente contaminados por numerosos microrganismos. Contrariamente, a septicemia e as infecções de ferimentos por *Vibrio* acontecem nos meses quentes, quando o número de microrganismos na água do mar apresenta-se elevado (MURRAY et al., 2004).

V. parahaemolyticus é comum em águas oceânicas e costeiras. Em regiões temperadas, sua detecção está relacionada com a temperatura da água, e o organismo não é detectável até que a temperatura da água atinja aproximadamente 19°C a 20°C. Um estudo na área do Rio Rhode, na baía de Chesapeake (EUA), mostrou que os organismos sobrevivem em sedimentos durante o inverno e depois são liberados na coluna de água onde se associam com o zooplâncton entre abril e começo de junho (KANEKO; COLWELL, 1973). Em águas oceânicas, eles tendem a estar associados com moluscos (LISTON, 1973). Foi demonstrado que adsorve em partículas de quitina ou em copépodos (KANEKO; COWELL, 1973). Ao contrário do *V. parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* geralmente não são encontradas no oceano aberto e não podem tolerar as pressões hidrostáticas das profundezas do oceano (SAKAZAKI, 1983).

1.3.2 Patogenicidade ao homem

Nos últimos 30 anos, muitas espécies de *Vibrio* têm sido relacionadas a doenças tais como gastroenterites em pessoas saudáveis e septicemia em

pacientes debilitados, sobretudo portadores crônicos de doenças hepáticas (BARROS, 2004).

Os sintomas causados por infecções por *V. parahaemolyticus* surgem normalmente de 4 a 96 horas após a ingestão do alimento contaminado com um número elevado de microrganismos (100.000 a 10.000.000) e são típicos de uma gastroenterite: diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça, febre (raramente) e arrepios. Duram cerca de três dias e a evolução clínica da infecção é normalmente favorável. Em situações excepcionais foram descritas formas mais severas da infecção, nomeada disenteria fulminante, com uma sintomatologia que se assemelha à observada nos casos de cólera (SEGURANÇA, 2007). Também podem ocorrer infecções de ferimentos por exposição à água do mar contaminada (MURRAY et al., 2004). A transmissão de infecções por *Vibrio* ocorre primariamente pela ingestão de mariscos crus (COOK et al., 2001).

Um surto relacionado ao consumo de ostras foi registrado no Alasca tendo como agente causador o *V. parahaemolyticus* sorotipo O6:k18. Nesse evento, 62 pessoas foram hospitalizadas, sendo que em dez, a bactéria foi confirmada em cultura (MC LAUGHLIN et al., 2005).

Outro caso aconteceu no Rio de Janeiro, quando a presença de *V. parahaemolyticus* foi avaliada em cinquenta amostras de moluscos bivalves marinhos compostas por quarenta ostras coletadas em quinze restaurantes da cidade e 10 mexilhões capturados de banco natural em Ponta de Itaipú - Niterói. Os resultados apontaram elevada incidência da bactéria em ostras comercializadas em restaurantes (PEREIRA et al., 2004).

A aderência a células epiteliais é uma importante propriedade de virulência de bactérias Gram-negativas. Aparentemente, *V. parahaemolyticus* produz hemaglutininas associadas a células que se correlacionam com a aderência à mucosa intestinal (YAMAMOTO; YOKOTA, 1989).

Em um estudo envolvendo catorze voluntários que ingeriram quantidades maiores do que 10^9 células de *V. parahaemolyticus*, nenhum ficou doente, contudo, uma só pessoa que ingeriu, acidentalmente, cerca de 10^7 células de *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivo (K+) apresentou sintomatologia da doença (SAKAZAKI, 1979). Em outro estudo, 2×10^5 a 3×10^7 células K+ produziram sintoma em voluntários, enquanto 1.010 células de linhagem Kanagawa negativo (K-) não produziram nenhum sintoma (SAKAZAKI, 1983; TWEDT et. al, 1980). Algumas linhagens K- já foram associadas a surtos (BARRAW; MILLER, 1976; SAKAZAKI, 1979).

Alimentos marinhos incluindo peixes nectônicos e crustáceos são altamente perecíveis devido a sua alta atividade de água, pH neutro e presença de enzimas autolíticas. Assim, eles deveriam ser adequadamente preservados através de métodos eficientes. O estabelecimento de uma estocagem adequada em frio e um processamento bem feito aumentam a preservação do frescor do pescado e conseqüentemente sua qualidade (LIMA DOS SANTOS et al., 1981).

Assim, o objetivo dessa pesquisa foi testar a recuperação de cepas de *V. parahaemolyticus* inoculadas em camarões, *Litopenaeus vannamei*, livre de *Vibrio* e incubado em diferentes temperaturas de refrigeração: caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

2.1.1 Camarão

A matéria-prima utilizada como substrato para inoculação de cepa de *V. parahaemolyticus* foi o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, obtido na feira de pescado da Praia do Mucuripe, Fortaleza-Ceará, que era transportado até o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) para então se proceder o experimento.

No período de outubro de 2005 a março de 2006 foram realizadas seis repetições, utilizando-se sempre camarão marinho com carapaça e cabeça, sendo cada lote de 1.500 g.

2.1.2 Cepa de *Vibrio parahaemolyticus* usada na infecção dos camarões

A cepa de *V. parahaemolyticus* sorotipo K 15, utilizada neste experimento, foi cedida pela FIOCRUZ, Rio de Janeiro e foi isolada de um surto de gastroenterite acontecido em Cascavel - CE em 1975 (HOFER, 1983). A cepa era conservada em ágar-tripticase-soja (TSA-Difco) 3% de NaCl e estocada em estufa B.O.D.

2.1.3 Tratamento da cepa

Com o intuito de se inocular um grande número de células, a cepa de *V. parahaemolyticus*, mantida em TSA 3% de NaCl, era renovada a cada 24 horas. Desse crescimento tirava-se um inóculo e repicava-se em 150 mL de caldo triptona-soja (TSB) 3% e incubava-se por 24 horas a 37°C. Decorrido esse tempo, os 150 mL do meio eram transferidos para erlenmeyer contendo 1.350 mL de TSB 3% de NaCl para que o inóculo fosse aumentado.

2.1.4 Experimento piloto

Foi feito um experimento piloto para se testar a temperatura e o tempo ideal para se eliminar qualquer vibrio que estivesse presente na amostra de camarão, uma vez que no experimento seriam inoculados camarões totalmente livres de vibrios. Para tanto, foi usado um caldo de TSB 3% NaCl inoculado com cepas puras de *V. parahaemolyticus*.

A cultura de *V. parahaemolyticus* (em 150 mL TSB 3%) era diluída em um béquer de 2.500 mL contendo 1.350 mL de TSB 3%. O camarão (1.500 g), previamente limpo, ficava em contato por cinco minutos com a diluição de TSB 3%. Depois de se retirar uma alíquota de 25 g (tempo zero), o restante era colocado em contato com água fervente sendo recolhidos 25 g do camarão a cada cinco minutos, até os 20 minutos, para serem homogeneizados em salina 3% estéril e diluídos até 10^{-6} . Depois eram então plaqueados em ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS - Difco) e essa operação foi repetida até que se soubesse qual o tempo ideal para que não fosse recuperada mais nenhuma célula de *V. parahaemolyticus*. Só assim poder-se-ia novamente

infectar os camarões tendo-se a certeza de que nenhum *V. parahaemolyticus* (natural da microbiota do camarão) interferisse nos resultados. Foram estriadas placas de TCBS antes (controle positivo) e depois da eliminação dos vibrios pelo calor em temperatura previamente testada (Figura 1).

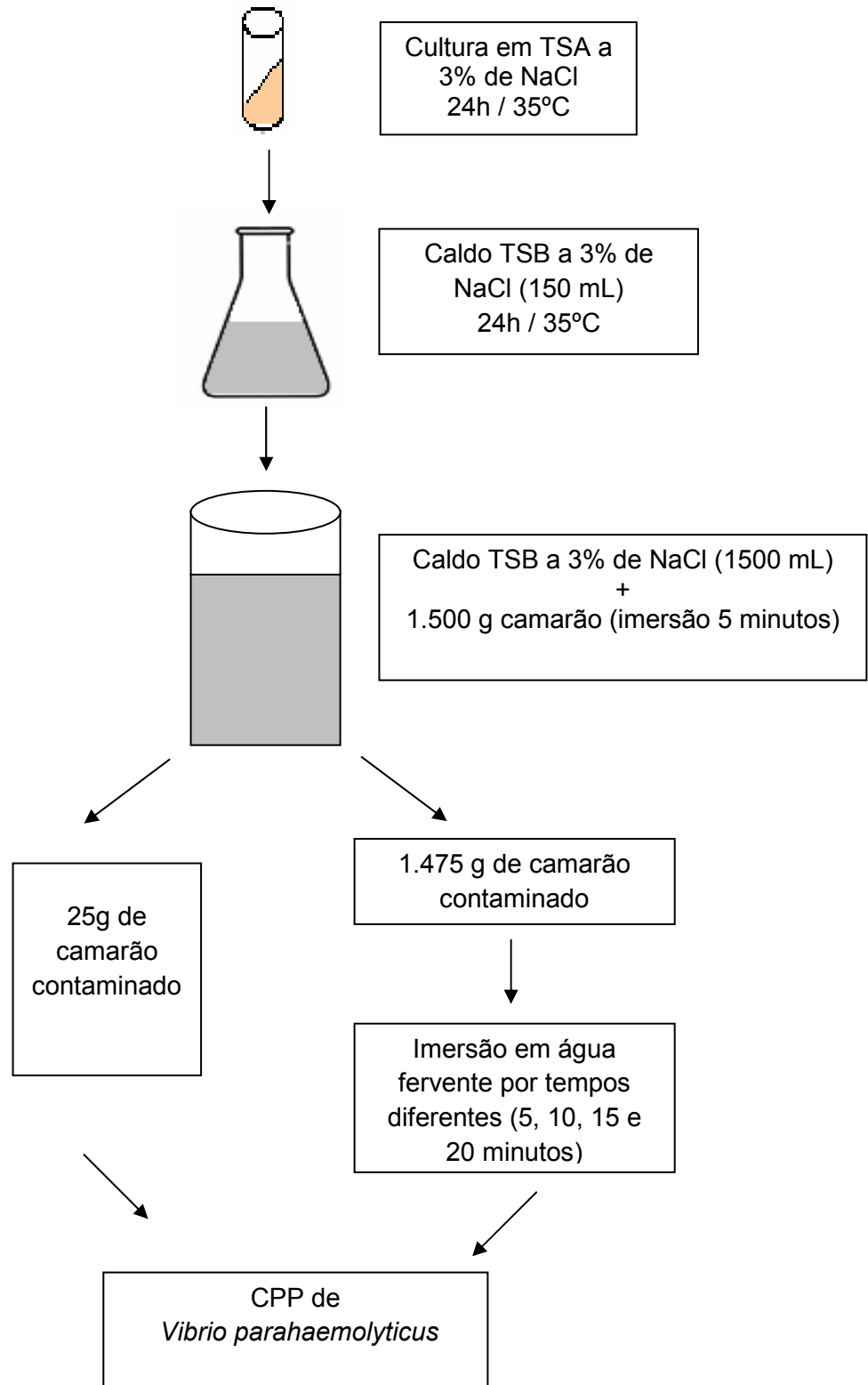


FIGURA 1 – Esquema da contaminação dos camarões e determinação do tempo ideal para eliminação das cepas de *Vibrio parahaemolyticus* inoculadas nos camarões *Litopenaeus vannamei* – Experimento piloto.

2.1.5 Tratamento dos camarões

As amostras constavam de 1.500 g de camarão marinho, as quais eram separadas de contaminantes macroscópicos, sendo posteriormente lavadas por duas vezes com água destilada para a remoção de sujidades. Objetivando eliminar as bactérias da sua microbiota de origem, o camarão era imerso em água fervente por cinco minutos (tempo já confirmado como ideal para eliminar a microbiota contaminante).

Para se confirmar a eliminação da microbiota, uma alíquota de 25 g era homogeneizada em 225 mL de solução salina 3% de NaCl estéril e feitas diluições até 10^{-6} . Procedia-se o plaqueamento nos meios de TCBS usando-se técnicas de espalhamento para se testar a presença de bactérias sacarose negativa em paralelo ao experimento. As placas eram então incubadas por 24 horas, a 35°C em estufa. Após esse tempo era observado se havia crescimento de alguma colônia nas placas.

2.1.6 Contaminação dos camarões

A cultura de *V. parahaemolyticus* em 150 mL TSB 3% era diluída em béquer de 2.500 mL contendo 1.350 mL de TSB 3%.

O camarão, já livre de microrganismos, era artificialmente contaminado por contacto durante cinco minutos com essa cultura. Após esse tempo eram feitas diluições do caldo TSB 3% contaminado e tomado 0,1 mL que era então inoculado em placas de TCBS para quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *V. parahaemolyticus* usadas na contaminação do camarão.

Esta era a contagem do inóculo e, sua quantificação era feita através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP).

Ao final da contaminação, a amostra de camarão era dividida em quarenta frações de 25 g cada, sendo uma dessas frações, Tempo Zero (T. 0), também homogeneizada e nela procedia-se a contagem dos vibrios do tempo inicial, feita através do método de CPP. As outras 39 frações eram acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, envolvidas com papel filme e divididas em três lotes. Cada lote era estocado em três diferentes temperaturas: treze lotes eram estocados em caixa isotérmica com gelo, em temperaturas que variaram entre -1°C e 13°C , suspensos em estantes para evitar a entrada de gelo derretido nas placas de Petri (o gelo era repostado a cada 24 horas), treze em geladeira a 11°C e treze em freezer a -21°C (Figura 2).

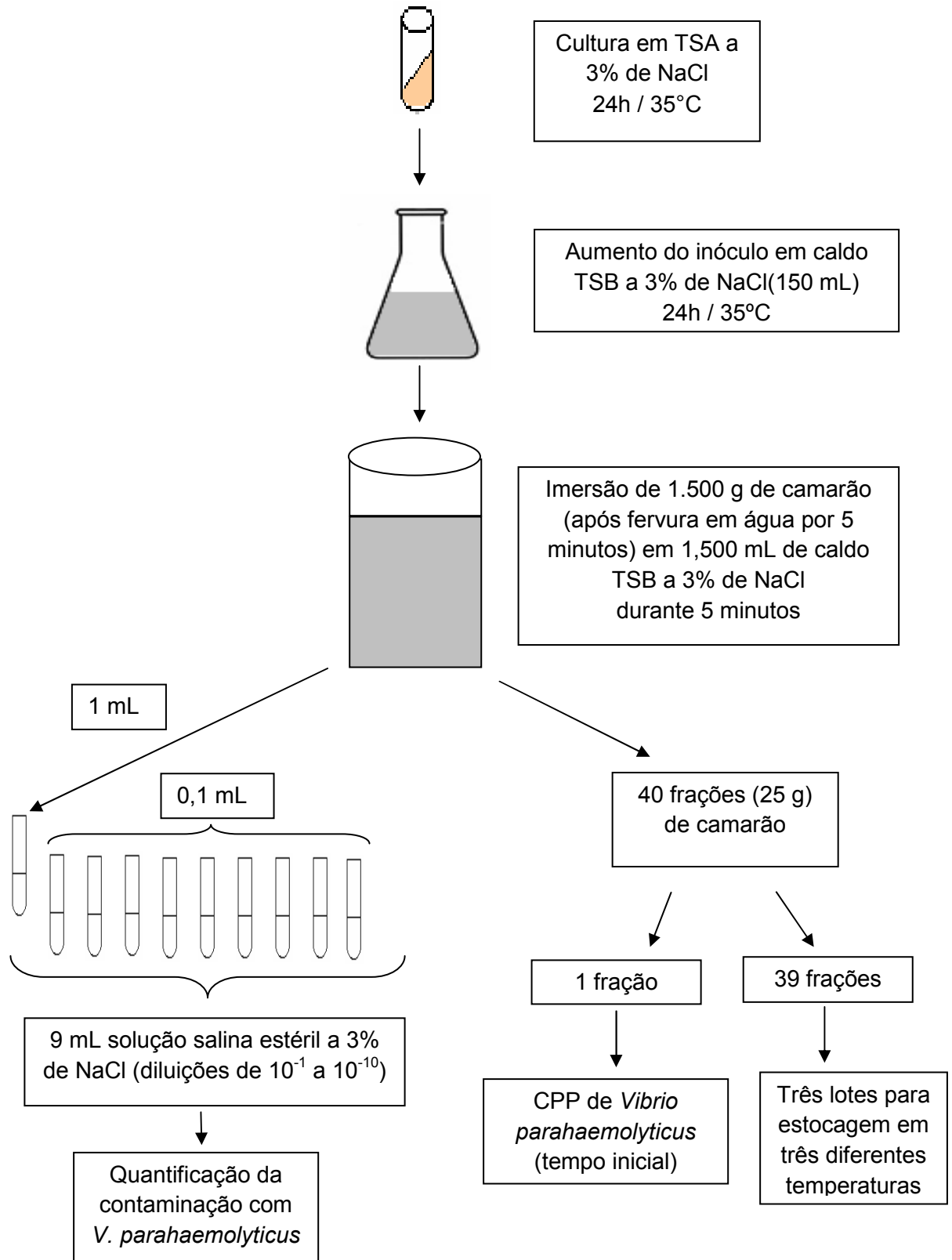


FIGURA 2 – Esquema para contaminação dos camarões com *Vibrio parahaemolyticus* quantificação do inóculo inicial e preparação dos lotes para armazenagem nas três diferentes temperaturas (-1 a 13°C, 11°C e -21°C).

2.1.7 Resistência de *Vibrio parahaemolyticus* em temperatura de caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer

2.1.7.1 Preparação do homogenato e inoculação das placas de plate count ágar e de ágar tiosulfato citrato-bile-sacarose

Diariamente uma amostra de cada lote era retirada para ser analisada. As amostras eram homogeneizadas em 225 mL de solução salina 3% de NaCl por um minuto. Eram feitas diluições sucessivas até 10^{-7} e inoculadas em meio de TCBS e até 10^{-10} e inoculadas em meio plate count ágar (PCA) e alíquotas de 0,2 e de 1,0 mL, eram plaqueadas em duplicata, respectivamente. As placas eram incubadas por 18 a 24 horas a 35°C quando então eram lidos os resultados. As placas escolhidas eram sempre aquelas que apresentavam número de colônias entre 25 e 250. Todas as contagens eram acompanhadas por uma placa-controle plaqueada com *V. parahaemolyticus*, tanto em meio de PCA, como em TCBS, incubadas por 24 e 18 h, respectivamente, a 35°C (Figura 3).

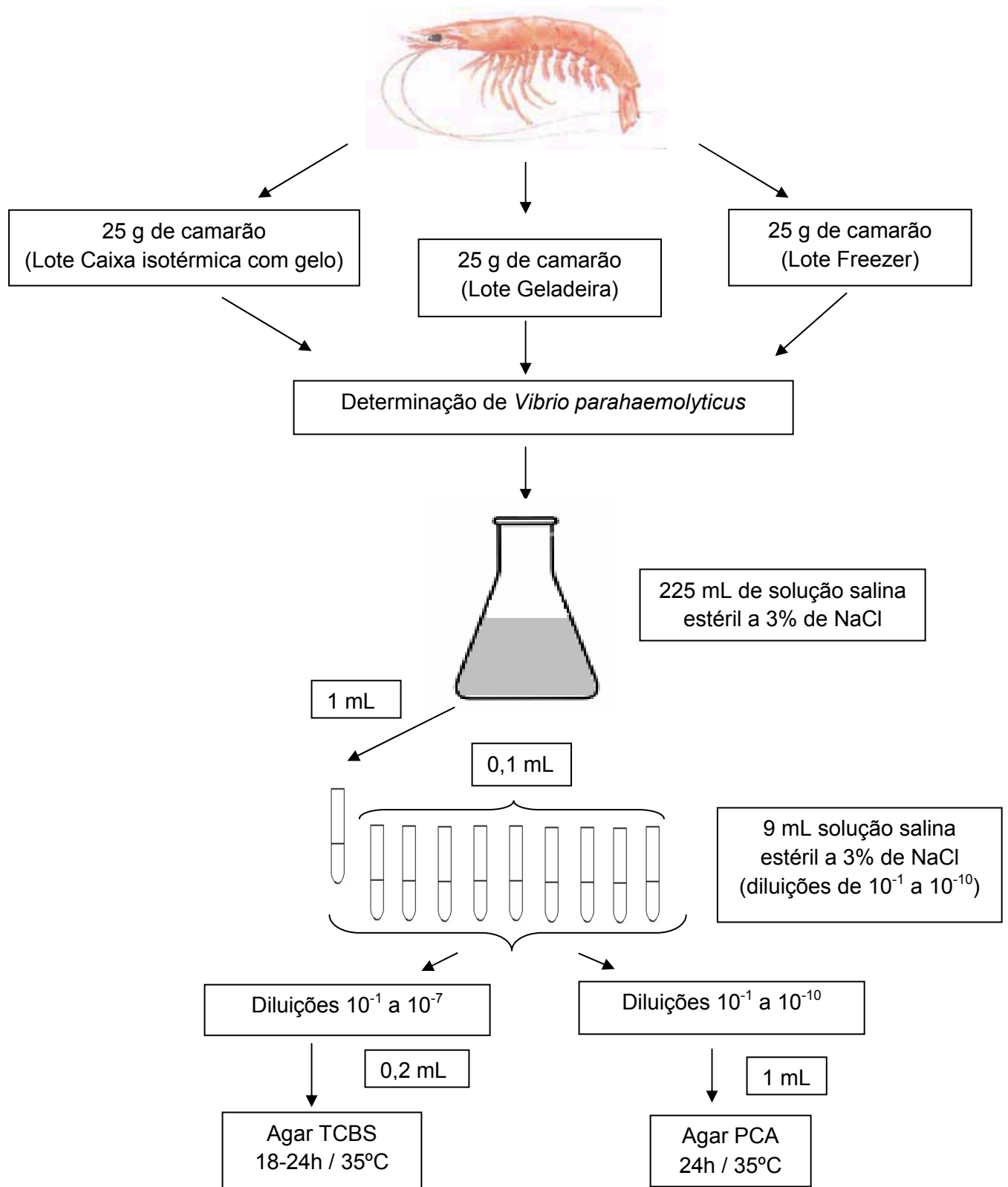


FIGURA 3 – Esquema para quantificação de *Vibrio parahaemolyticus* em meio de ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS) e plate count ágar (PCA) dos lotes de armazenagem nas três diferentes temperaturas pelo Método de Contagem Padrão em Placas (CPP).

2.1.8 Análise estatística

A análise estatística da influência da refrigeração produzida por caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer (definidos como tratamentos) sobre os valores da UFC/g de *V. parahaemolyticus*, nas condições de TCBS e PCA, foi realizada com três objetivos.

1 - Comparar a eficiência dos tratamentos na redução da UFC/g

2 - Comparar a taxa relativa de redução da UFC/g em função do tempo de atuação dos tratamentos

3 - Estimar o valor do intervalo de tempo necessário para anular a contaminação por *V. parahaemolyticus*.

2.1.8.1 Comparação da eficiência dos tratamentos na redução da UFC/g

Esta análise foi realizada em duas etapas: (a) avaliar a significância da aceitação ou rejeição da hipótese de nulidade de que os três tratamentos não influenciam o valor de UFC/g, para um nível $\alpha = 0,05$; (b) fazer a comparação binária dos tratamentos para decidir quais são estatisticamente diferentes entre si, através do Teste de Dunn.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, representado pela variável padronizada H , tem distribuição aproximadamente igual à do χ^2 , com zona de rejeição unilateral e número de graus de liberdade, $GL = k - 1$, sendo $k = 3$, com base na respectiva tabela de distribuição teórica.

A fórmula de cálculo da estatística H é a seguinte:

$$H = \frac{\left(\frac{12}{N(N+1)} \sum \frac{KR_i^2}{n_j} \right) - 3(N+1)}{1 - \frac{\sum T}{N^3 - N}} \quad (1)$$

onde:

k = número de tratamentos;

n_j = número de repetições no tratamento j;

N = número total de observações;

R_j = soma dos postos no tratamento j;

$T = t^3 - t$;

t = número de observações em cada grupo de escores empatados;

$\sum T$ = somatório de todos os grupos com escores empatados.

Para aplicação desse teste, foi adotado o seguinte procedimento:

- Os valores de UFC/g (score), para cada tratamento (caixa isotérmica com gelo, geladeira, freezer), foram ordenados em escala crescente, aos quais foram atribuídos postos desde 1 até um valor máximo correspondente ao último dado da série ordinal.
- O valor de R_i^2/n_i foi calculado para cada tratamento i, cujo somatório [$\sum (R_i^2/n_i)$] foi introduzido na Equação 1.
- Em caso de repetição do escore, foi calculada a média dos números dos postos correspondentes aos valores iguais, passando esta a representar a posição dos postos originais.

O Teste de Dunn, representado pela variável padronizada Q, tem distribuição aproximadamente igual à do χ^2 , com zona de rejeição unilateral e

número de graus de liberdade, $GL = k - 1$, sendo $k =$ número de tratamentos consecutivos; portanto, $GL = 2 - 1 = 1$, para um nível de significância $\alpha = 0,05$.

A fórmula de cálculo da estatística Q é a seguinte:

$$R = \frac{\bar{R}_i - \bar{R}_j}{SE} \quad (2)$$

A estimação do erro padrão da diferença entre médias (SE) é feita através da seguinte equação:

$$SE = \sqrt{\frac{N(N+1)}{12} - \frac{\sum T}{12(N-1)} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)} \quad (3)$$

onde:

R_i = somatório dos postos no tratamento i;

$\bar{R}_i = R_i/n_i$;

R_j = somatório dos postos no tratamento consecutivo j;

$R_i = R_i/n_i$;

n_j = número de observações no tratamento j;

n_i = número de observações no tratamento i;

N = número total de observações.

Se a hipótese de nulidade do Teste de Kruskal-Wallis tiver sido rejeitada, designando diferença estatisticamente significativa entre os valores de UFC/g, as médias dos somatórios dos postos (\bar{R}) em cada tratamento passam a ser comparadas consecutivamente, duas a duas, no caso, caixa isotérmica com gelo x geladeira, caixa isotérmica com gelo x freezer e geladeira x freezer.

2.1.8.2 Comparação da taxa relativa de redução da UFC/g em função do tempo de atuação dos tratamentos

A taxa relativa de redução da UFC/g de *V. parahaemolyticus* foi estimada como o coeficiente angular da regressão do tipo:

$$\frac{Y}{X} = a - bX \quad (4)$$

onde,

$$Y = \log_{10} \text{UFC/g}$$

$$Y = \log_{10} \text{UFC/g};$$

X = tempo de atuação dos tratamentos, em dias.

Como base para o uso desse modelo, a existência de correlação estatisticamente significativa entre as variáveis foi testada pelo coeficiente de correlação, r para um nível $\alpha = 0,05$. Os valores da taxa relativa de redução da UFC/g, estimada como o coeficiente angular (b) da regressão foram comparados, dois a dois para os três tratamentos, portanto, caixa isotérmica com gelo x geladeira, caixa isotérmica com gelo x freezer e geladeira x freezer, de acordo com as seguintes hipóteses, as notações 1 e 2 designando os dois tratamentos sob teste, em seqüência:

$$\text{Hipótese } H_0: b_1 = b_2$$

$$\text{Hipótese } H_a: b_1 \neq b_2$$

A fórmula de cálculo da variável padronizada t é a seguinte:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{S_{(b_1 - b_2)}} \quad (5)$$

sendo,

$$S_{(b1-b2)} = \sqrt{\frac{(S^2_{yx})_p}{(S_{xx})_1} + \frac{(S^2_{yx})_p}{(S_{xx})_2}} \quad (6)$$

$$(S^2_{yx})_p = \frac{(SQ_{residual})_1 + (SQ_{residual})_2}{(GL_{residual})_1 + (GL_{residual})_2} \quad (7)$$

2.1.8.3 Estimação do valor do intervalo de tempo necessário para anular a contaminação por *Vibrio parahaemolyticus*

O valor do intervalo de tempo necessário para anular a contaminação por *V. parahaemolyticus* foi estimado fazendo-se $Y/X = 0$ na Equação 4: $0 = a - bX$, de modo que,

$$X = \frac{a}{B} \quad (8)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento piloto realizado para determinar a eficiência da eliminação da microbiota dos camarões através de tratamento térmico, foi possível constatar, através de plaqueamento em meio ágar TCBS, que nenhuma célula de *Vibrio* permaneceu viável após a exposição dos crustáceos à água fervente por cinco minutos. A partir daí, ficou decidido que esse seria o tempo de exposição das células de *V. parahaemolyticus* a ser usado no experimento-problema. Ter-se-ia então certeza de que o inóculo do *Vibrio* infectante, usado no experimento, seria conhecido, uma vez que nenhuma célula de *Vibrio* precontaminante do camarão marinho estaria presente.

Os resultados das contagens em TCBS e em PCA, de *V. parahaemolyticus* dos homogenatos de camarão estocados em diferentes temperaturas: em caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), na geladeira (11°C) e no freezer (-21°C), por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias estão expressos nas Tabelas 1 e 2 (valores logaritimizadas) e nas Figuras 4 e 5.

TABELA 1 – Resultados logaritmizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/g) em ágar tiosulfato citrato-bile sacarose preparado com camarões *Litopenaeus vannamei* estocados às temperaturas de caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias.

<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (UFC/g)																		
Dias	Caixa Isotérmica com gelo						Geladeira						Freezer					
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6
T.0	5,5	6,7	4,7	4,7	7,7	7,8	5,5	6,7	4,7	4,8	7,8	7,8	5,5	6,7	4,7	4,8	7,8	7,8
1	7,8	9,0	7,6	9,2	9,6	8,7	4,9	7,8	5,8	5,3	7,4	6,9	4,7	5,2	3,7	4,4	5,2	7,1
2	7,7	9,0	9,2	9,7	9,8	8,0	5,1	5,8	5,9	6,1	9,3	6,0	4,1	3,7	4,5	3,7	5,2	5,7
3	7,5	9,3	9,0	10,0	10,6	8,3	6,0	7,1	6,5	7,4	8,8	5,1	3,7	3,5	3,8	2,7	3,7	4,2
4	7,6	9,1	9,8	9,1	10,2	9,1	5,7	5,6	4,8	6,4	8,1	4,7	3,5	3,5	2,7	0	4,7	4,6
5	7,1	7,0	8,9	7,7	8,6	7,4	5,4	7,1	6,0	5,4	7,0	3,8	2,7	4,0	2,7		4,3	3,7
6	6,7	7,9	7,8	8,0	9,5	7,6	4,3	6,2	6,5	4,3	7,2	4,2	3,0	2,7	0		4,2	4,4
7	7,9	7,2	7,5	8,0	8,5	7,6	4,3	5,4	5,9	5,6	6,4	5,4	2,7	2,7			3,5	4,2
8	7,0	4,7	9,2	8,5	9,6	9,3	4,2	6,9	7,2	3,8	7,4	4,7	0	0			0	3,4
9	5,0	5,8	7,4	7,9	8,8	7,4	4,5	6,4	6,9	0	7,4	3,7						0
10	4,7	5,5	7,5	6,8	7,2	5,0	3,7	5,4	5,3		4,7	3,9						
15	0	5,2	6,4	0	6,0	0	3,4	4,4	4,7		4,5	3,5						
20		0	0		0		2,7	0	4,2		4,1	0						
25							0		0		0							

T.0:Tempo Zero
R: Repetição

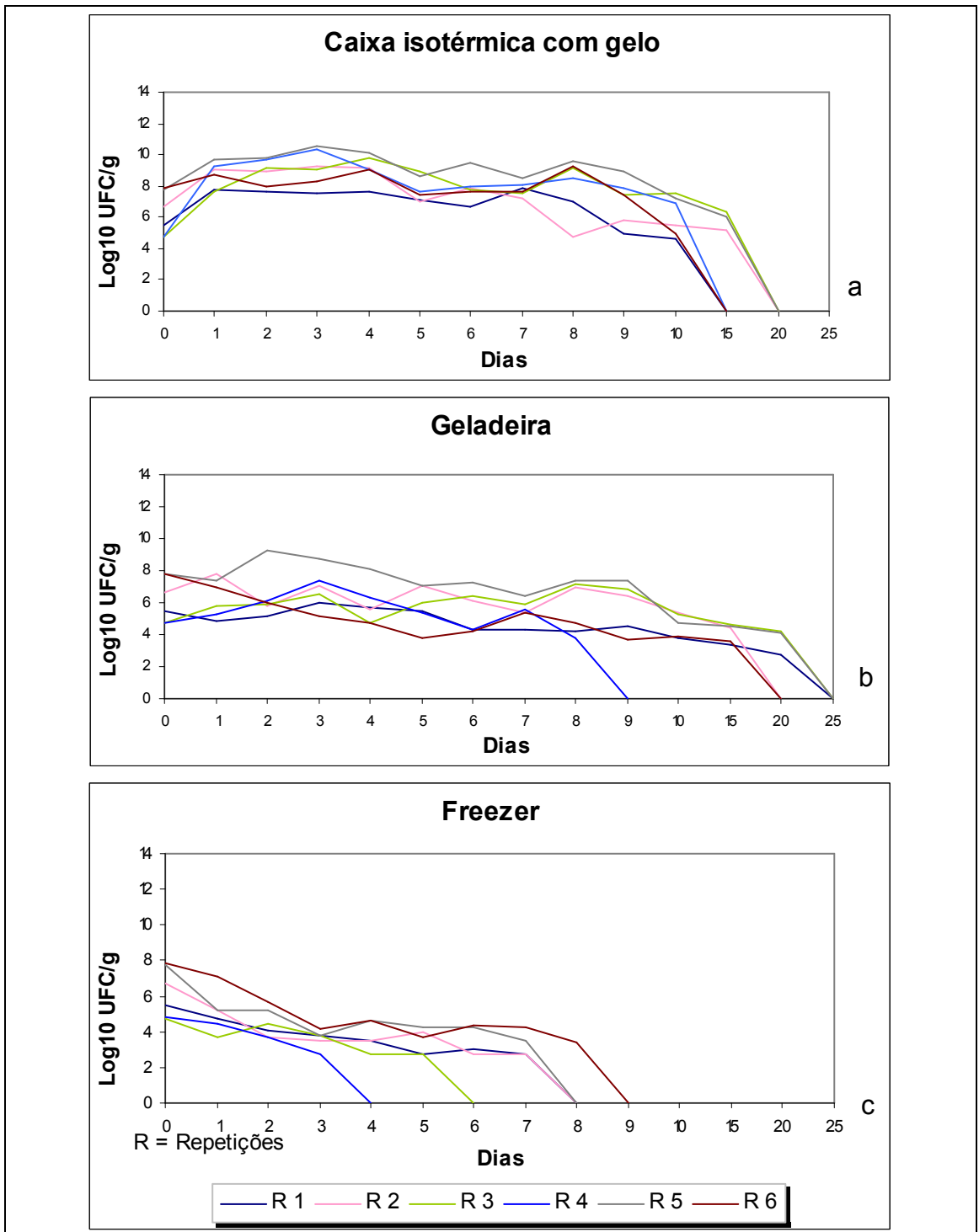


FIGURA 4 – Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em ágar tiossulfato citrato-bile sacarose, a partir do homogenato preparado com camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados em diferentes temperaturas (-1 a 13°C(a), 11°C(b) e -21°C(c)) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias.

Analisando-se a Tabela 1 e a Figura 4, observam-se oscilações nas contagens das UFC de *V. parahaemolyticus* na incubação dos camarões em caixa isotérmica com gelo, que podem ser atribuídas às variações na temperatura do sistema, com o decorrer das horas, pelo derretimento do gelo. Outro fator que pode ter influenciado na multiplicação inicial do inóculo na temperatura de caixa isotérmica com gelo, era o fato de que a cada 24 horas o sistema era aberto para que se retirasse a amostra e se completasse o gelo, o que aumentava sobremaneira a temperatura do ambiente, favorecendo a multiplicação das células que por acaso ainda estivessem viáveis. Até o próprio inóculo poderia ter sido um fator de erro uma vez que não se tem certeza se ele estaria ou não na fase logarítmica de crescimento. O mesmo raciocínio pode ser usado para estocagem dos camarões em geladeira. No entanto, neste caso, os experimentos 2, 3 e 4 tiveram um ligeiro aumento em relação ao inóculo.

O fato das bactérias adaptadas ao frio crescerem em temperaturas de resfriamento e congelamento com crescimento equivalente ou muito menor que o de mesófilas significa que elas devem conter proteínas (enzimas) adaptadas para funcionar em baixas temperaturas (RUSSELL, 2002).

A mesma observação foi feita por Gooch et al. (2002) que ao analisarem o tempo de geração de *V. parahaemolyticus* em amostras refrigeradas de ostras, verificaram um elevado aumento de células após 24 horas de refrigeração, com uma diminuição após 14 dias de armazenagem.

Segundo Panoff et al. (1994) quando culturas são transferidas de 30°C para 10°C, a taxa de crescimento é reduzida. O crescimento continua a baixas

taxas, mas alcança o máximo de densidade ótica após 25 horas, momento que a sobrevivência é maior.

Somente as incubações do homogenato em freezer, nos seis experimentos, tiveram seu inóculo reduzido desde o Tempo Zero a, no máximo, nove dias, quando contados em TCBS. Observa-se que o experimento 4, na estocagem de freezer, teve já no 3º dia, um percentual de redução de 99,16. Por outro lado, foram necessários sete dias para que ocorresse uma redução de 99,99% no experimento 5 e oito dias, no 6. Este fato pode ser atribuído às diferenças entre tamanho de inóculos uma vez que apesar de ter sido usada, sempre, a mesma cepa e o mesmo diâmetro de alça de níquel cromo, quando medidos por CPP em meio TCBS, esses inóculos variaram nas suas contagens (Tabela 1). Segundo Vieira (2004), o método da Contagem Padrão em Placas (CPP) estima o número de células viáveis contido em um alimento qualquer. Entretanto, é um método passível de erros, uma vez que células estressadas podem não se desenvolver no meio, mesmo estando presentes no alimento.

Segundo Russell (2002), a estocagem de alimentos processados em baixas temperaturas, reduz as taxas metabólicas dos microrganismos infectantes desse alimento e, conseqüentemente, a sua habilidade de sobrevivência e de multiplicação.

Cowell e Huq (1994); Ravel et al. (1995); Kell et al. (1998), estudando a resposta a tolerância do *V. cholerae* O1 a baixa temperatura verificaram que algumas células em cultura podem ser recuperadas do estado de latência com baixa atividade metabólica celular a fim de competir na temperatura de 5°C, abaixo do ótimo de crescimento (35°C). *V. parahaemolyticus* também tem um

ótimo de temperatura entre 35°C e 37°C (BEUCHAT, 1982) e tal raciocínio também pode ser aplicado nesse caso.

Burnham (2006) mostrou que várias cepas de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* crescidas em TSB possuem diferenças significativas no crescimento e sobrevivência quando estocadas a 5°C, 8°C ou 10°C por 10 dias. Cepas de *V. vulnificus* estariam em estado viável mas não cultivável quando transferidas de 37°C para 5 ou 8°C enquanto que, a maioria poderia crescer a 10°C. Cepas de *V. parahaemolyticus* sobreviveram, mas não cresceram quando transferidas de 37°C para 5°C, mas cresceram durante o armazenamento em 8°C ou 10°C.

As tabelas 1 e 2 e figuras 4 e 5, quando comparadas, mostram que a redução nas UFC de *V. parahaemolyticus* das placas de TCBS, em freezer, é mais rápida do que em PCA. Levanta-se a hipótese de que o meio ágar PCA, sendo não seletivo, favoreceria o crescimento de algumas outras bactérias presentes no camarão e que teriam resistido à fervura. É importante frisar que o TCBS é seletivo para vibrios, enquanto o ágar PCA é favorável ao crescimento de todas as bactérias sendo muito menos impediante que o TCBS, razão porque os números de UFC/g em placas de PCA são bem mais elevados do que aqueles encontrados em contagens de TCBS.

É possível se verificar nas Tabelas 1 e 2 e nas Figuras 4 e 5 que houve, no geral, pequenos aumentos nas contagens de UFC/ g de *V. parahaemolyticus* no meio em TCBS e pequenas quedas em PCA durante alguns dias, nas temperaturas de incubação em caixa isotérmica com gelo e em geladeira, o mesmo não acontecendo nas temperaturas de freezer.

Mesmo em PCA, as contagens em freezer tenderam sempre a diminuir, o que atesta o efeito deletério do frio a células bacterianas. A única diferença apresentada pelos diferentes experimentos foi quão mais rápido o inóculo inicial foi zerado.

A mesma observação foi feita por Lamprecht (1980) que, trabalhando com caudas de lagosta inoculadas com *V. parahaemolyticus* e estocadas em -16°C, constatou que dependendo do inóculo inicial, se pouco ou muito, a bactéria resistiria de uma semana a três meses.

TABELA 2 – Resultados logaritmizados das contagens de *Vibrio parahaemolyticus* (UFC/g) em plate count ágar a partir do homogenato preparado com camarões *Litopenaeus vannamei* estocados às temperaturas de caixa isotérmica com gelo (-1 a 13°C), geladeira (11°C) e freezer (-21°C) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias.

<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (UFC/g)																		
Dias	Caixa Isotérmica com gelo						Geladeira						Freezer					
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6
T.0	6,6	7,31	4,7	5,5	7,8	8,0	6,6	7,3	4,7	5,5	7,8	8,0	6,6	7,3	4,7	5,5	7,8	8,0
1	8,8	10,0	8,4	9,0	9,6	9,8	6,3	8,9	6,6	9,0	9,3	7,0	4,8	5,9	4,5	3,7	5,3	6,1
2	7,6	10,4	9,7	9,1	9,2	7,9	5,8	9,6	7,4	9,1	8,9	6,4	4,7	5,9	4,0	2,6	4,7	6,4
3	8,3	11,2	9,7	8,0	10,0	8,3	5,0	9,7	6,9	8,0	8,7	6,1	4,3	6,9	3,1	3,1	4,3	4,7
4	8,6	11,2	10,7	9,1	9,8	9,7	6,7	8,7	7,8	9,1	8,1	7,7	5,2	6,9	3,0	2,9	4,7	4,8
5	9,9	10,9	10,7	7,1	7,7	8,4	8,2	10,7	7,9	7,1	6,8	7,3	4,8	5,6	2,7	-	4,7	4,8
6	10,7	11,7	11,7	9,1	8,9	8,6	7,2	10,4	8,7	8,6	7,1	8,1	4,0	5,0	2,3		4,4	4,3
7	10,2	12,0	9,0	9,7	8,4	9,7	9,1	11,6	9,7	9,7	7,9	7,4	3,4	4,6	-		3,7	3,9
8	10,3	12,7	9,7	8,7	9,5	10,1	8,5	10,7	9,0	8,7	9,4	8,7	2,7	3,7			3,4	3,3
9	9,0	12,5	10,7	8,9	9,2	11,7	9,2	11,7	9,3	8,7	9,2	9,7	-	-			-	2,9
10	9,8	11,9	10,7	9,7	10,7	12,6	9,1	11,5	9,4	-	10,7	9,3						-
15	10,1	12,9	9,1	10,1	11,7	11,7	9,4	10,8	8,4		11,5	10,1						
20	-	11,1	9,0	-	11,7	-	10,0	10,4	8,2		11,7	9,7						
25		-	-		-		9,3	-	7,6		11,6	-						
							-		-		-							

T.0:Tempo Zero

R: Repetição

- : Ausência de dados

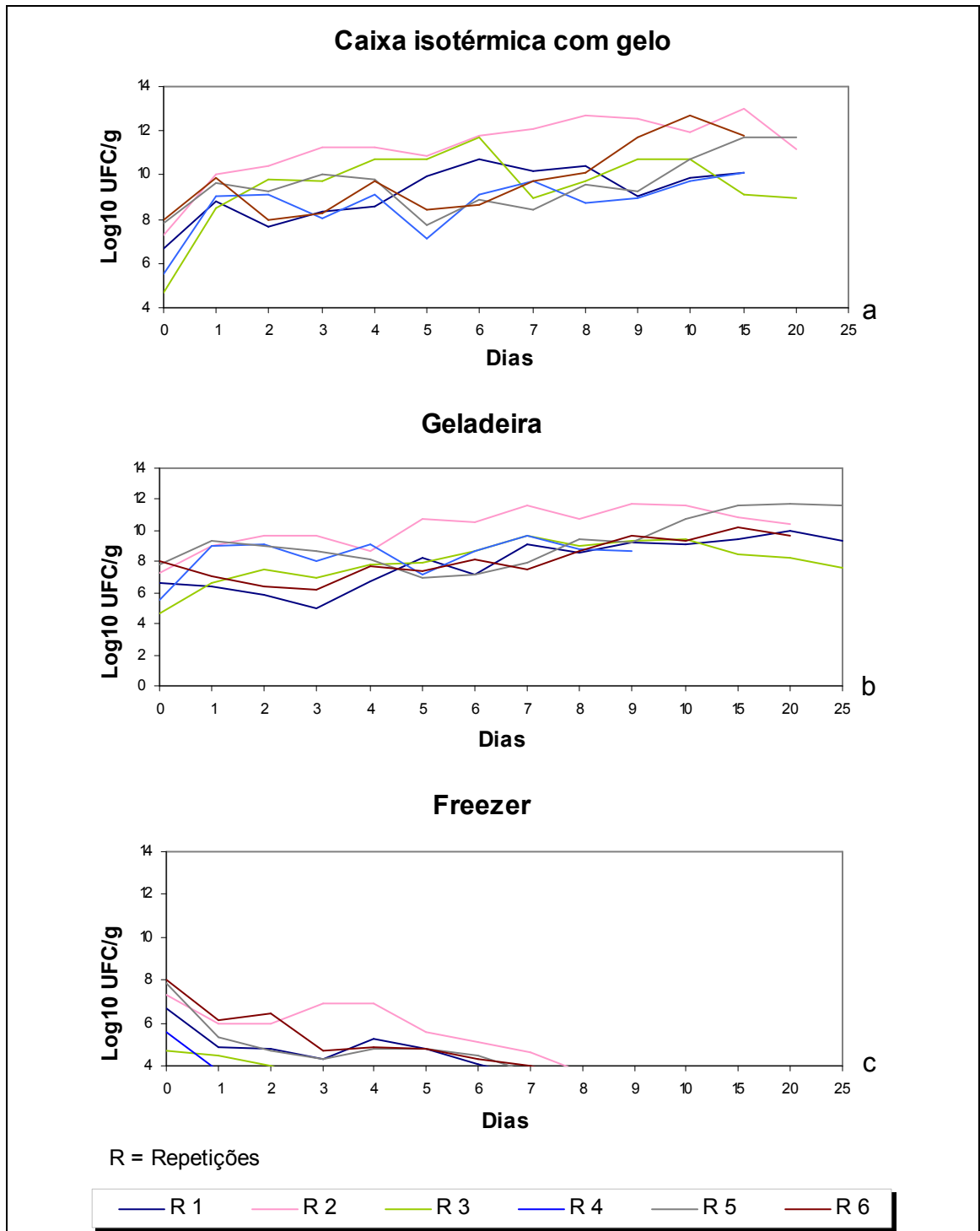


FIGURA 5 – Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em plate count ágar, a partir do homogenato preparado com camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados em diferentes temperaturas (-1 a 13°C(a), 11°C(b) e -21°C(c)) por um período contínuo de dez dias, e nos 15^o, 20^o e 25^o dias.

Quando a estocagem dos camarões foi feita em caixa isotérmica com gelo e as contagens em PCA, todos os inóculos iniciais aumentaram. É válido o mesmo raciocínio empregado anteriormente para as contagens de *V. parahaemolyticus* em TCBS. Provavelmente, o inóculo estaria na fase logarítmica e/ou houve condições de temperatura para as células viáveis crescerem. As células mesófilas, que não os vibrios, se houvesse resistido ao calor, provavelmente poderiam ter se multiplicado, fato que explicaria o decaimento das células de *V. parahaemolyticus* até zero quando ainda havia crescimento de colônias no PCA (Tabela 2, Figura 4).

Quando os camarões foram estocados em geladeira e o homogenato foi contado em PCA, quatro repetições: 2, 3, 4 e 5 aumentaram na segunda contagem e depois decresceram com algumas oscilações entre o quinto e o vigésimo dia. Mesmo as outras repetições (1 e 6) que não tiveram um aumento no segundo dia, que corresponde ao dia 1, mais tarde, quase no final dos repetições também apresentaram este fato. Provavelmente, isto deveu-se ao fato de que alguma célula mesófila que houvesse resistido ao calor, teria se adaptado ao frio do ambiente e se multiplicado.

Ratificando essa idéia, Campbell; Williams (1952) relataram que a contagem bacteriana de camarões da Costa do Golfo estocados em gelo, caiu nos quatro primeiros dias devido ao declínio de bactérias mesófilas em temperaturas baixas, aumentando gradualmente até o fim da estocagem.

A maior redução nos valores das células viáveis, tanto em meio de TCBS quanto em PCA, ocorreu durante a estocagem em freezer (-21°C).

Na Figura 5c observa-se que o inóculo em PCA não chegou a zero. Isto deveu-se ao fato de que o objetivo era zerar a recuperação de *V. parahaemolyticus*, o que foi feito em TCBS em tempos diferentes. Tão logo esse fato aconteceu, o experimento foi encerrado. Células diferentes de *Vibrio* podem ter permanecido viáveis além de nove dias, o tempo mais demorado para a inviabilidade das células de *V. parahaemolyticus* em meio TCBS.

Os valores do intervalo de tempo (média das seis repetições) necessários para anular (em termos de contagem de colônias cultiváveis) a contaminação por *V. parahaemolyticus* foram os seguintes, para as células de *V. parahaemolyticus* crescidos em TCBS: (a) caixa isotérmica com gelo = 11,4 dias; (b) geladeira = 14,5 dias; (c) freezer = 7,0 dias. Esses dados mostram que o tempo necessário para anular a contaminação por *V. parahaemolyticus* decresce em função das estocagens: geladeira > caixa isotérmica com gelo > freezer.

A Conferência Interestadual de Sanitização de Moluscos realizada em Washington, D.C. (EUA), adotou um plano de controle, que requer refrigeração (<7,2°C) de ostras na Costa do Golfo com no máximo de 10-14 horas após a colheita (NSSP, 1997). Esta estratégia foi recomendada tendo por base de estudos a restrição no crescimento de *V. vulnificus* quando exposto a temperaturas baixas ($\leq 7,2^{\circ}\text{C}$) (BAKER et al., 1997; OLIVER, 1995).

Na presente pesquisa, a redução de temperatura na estocagem se mostrou eficiente para diminuir a carga bacteriana e até deixar as células viáveis mas não cultiváveis *V. parahaemolyticus* contaminantes de camarões marinhos.

Na Tabela 3 estão os dados relativos aos resultados obtidos com o teste de Dunn, para as comparações da eficiência, duas a duas, entre os tratamentos caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer, na eliminação do *V. parahaemolyticus*.

TABELA 3 – Resultados obtidos com o teste de Dunn, para as comparações da eficiência, duas a duas, entre os tratamentos caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezers na eliminação do *Vibrio parahaemolyticus* de camarões, *Litopenaeus vannamei*, estocados em diferentes temperaturas.

Tratamento	Postos	\bar{R}	SE	$\bar{R}_i - \bar{R}_j$	Valor de Q
TCBS					
Gelo	9.453,5	137,0	6,880	56,292	8,182**
Geladeira	5.811,5	80,7			
Gelo	9.453,5	137,0	6,306	96,193	15,253**
Freezer	1.755,0	40,8			
Geladeira	5.811,5	80,7	6,423	39,901	6,212*
Freezer	1.755,0	40,8			
PCA					
Gelo	10.514,5	140,2	7,165	32,572	4,546*
Geladeira	8.394,5	107,6			
Gelo	10.514,5	140,2	6,599	111,306	16,867**
Freezer	1.415,5	28,9			
Geladeira	8.394,5	107,6	6,707	78,734	11,739**
Freezer	1.415,5	28,9			

Observação: * = significante ao nível $\alpha = 0,05$; ** = significante ao nível $\alpha = 0,01$.

A análise estatística de discriminação dos tratamentos, comparados dois a dois, através do Teste de Dunn, produziu os seguintes resultados:

Condição de crescimento da bactéria em meio TCBS - (a) caixa isotérmica com gelo x geladeira: $\bar{R}_i = 137,0$; $\bar{R}_j = 80,7$; Q = 8,182 (P < 0,01); (b) caixa isotérmica com gelo x freezer: $\bar{R}_i = 137,0$; $\bar{R}_j = 40,8$; Q = 15,253 (P < 0,01); (c) geladeira x freezer: $\bar{R}_i = 80,7$; $\bar{R}_j = 40,8$; Q = 6,212 (P < 0,01).

Condição de crescimento da bactéria em meio PCA - (a) caixa isotérmica com gelo x geladeira: $\bar{R}_i = 140,2$; $\bar{R}_j = 107,6$; $Q = 4,546$ ($P < 0,05$); (b) caixa isotérmica com gelo x freezer: $\bar{R}_i = 140,2$; $\bar{R}_j = 28,9$; $Q = 16,867$ ($P < 0,01$); (c) geladeira x freezer: $\bar{R}_i = 107,6$; $\bar{R}_j = 28,9$; $Q = 11,739$ ($P < 0,01$).

Portanto, o poder de eliminação da bactéria pelos tratamentos se apresentou com a seguinte ordem decrescente: freezer > geladeira > caixa isotérmica com gelo.

Na Tabela 4 pode-se verificar os dados relativos aos resultados obtidos com o teste t, para as comparações, duas a duas, da taxa de decréscimo (b) da UFC/g de *V. parahaemolyticus* em função do tempo, entre os tratamentos caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer, para a condição de crescimento da bactéria em meio TCBS.

TABELA 4 – Resultados obtidos com o teste t, para as comparações, duas a duas, da taxa de decréscimo (b) da UFC/g de *Vibrio parahaemolyticus* inoculados em camarão, *Litopenaeus vannamei*, em função do tempo, entre os tratamentos caixa isotérmica com gelo, geladeira e freezer, para a condição de crescimento da bactéria em meio ágar tiossulfato-citrato-bile-sacarose (TCBS).

Tratamento	S_{xx}	$(s^2_{yx})_p$	$s_{(b_1-b_2)}$	$b_1 - b_2$	Valor de t
Gelo Geladeira	164,5 335,0	1,7441	0,1257	0,2174	1,729 ns
Gelo Freezer	164,5 42,0	1,6283	0,2206	0,0245	0,112 ns
Geladeira Freezer	335,0 42,0	1,1620	0,1764	0,2419	1,375 ns

Observação: ns = não-significante ao nível $\alpha = 0,05$.

A taxa relativa de redução da UFC/g, comparada duas a duas através do coeficiente angular das respectivas equações de regressões, para os três tratamentos, nas condições de TCBS e PCA, apresentou os seguintes resultados:

Condição de crescimento da bactéria em meio TCBS - (a) caixa isotérmica com gelo x geladeira: $t = 1,729$; $P > 0,05$; (b) caixa isotérmica com gelo x freezer: $t = 0,112$; $P > 0,05$; (c) geladeira x freezer: $t = 1,375$; $P > 0,05$.

Condição de crescimento da bactéria em meio de PCA - (a) gelo x geladeira: $t = 1,010$; $P > 0,05$; (b) gelo x freezer: $t = 0,708$; $P > 0,05$; (c) geladeira x freezer: $t = 1,484$; $P > 0,05$.

Tendo em vista que a hipótese de nulidade foi aceita em todas as comparações, conclui-se que a UFC/g de *V. parahaemolyticus* apresentou tendência de decréscimo em função do tempo de exposição aos tratamentos, mas apenas para a condição de crescimento da bactéria em meio TCBS. No entanto, para a condição de crescimento da bactéria em meio PCA, não foi possível realizar a análise estatística já que não se registrou tendência de decréscimo dos valores de UFC/g em função do tempo.

4. Conclusão

Todas as três temperaturas foram eficientes na redução de células viáveis de *V. parahaemolyticus*. O frio gerado por gelo, geladeira ou freezer inibe o crescimento dessa bactéria em camarões, sendo a temperatura do freezer, a mais eficiente na redução dessa espécie bacteriana em camarões.

Recomenda-se que os camarões comercializados sejam congelados uma vez que esta é a metodologia, na cadeia do frio, mais eficiente no combate ao *V. parahaemolyticus*, bactéria comum em pescados de águas marinhas.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABCC. A carcinicultura brasileira. **Revista da ABCC**, Recife, v.1, p.30-45, 2004.

BAKER, C. et al. **The lethal effect of cold shock on *Vibrio vulnificus***. 97th, Miami Beach: American Society for Microbiology, p. 324, 1997.

BARBIERI, E. et al. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.6, p. 2748-2753, 1999.

BARBIERI JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. Camarões marinhos – engorda. Viçosa: **Aprenda Fácil**, v. 2, 2002.

BARRAW, G. I.; MILLER, D.C. *Vibrio parahaemolyticus* and seafoods. In: SKINNER, F. A.; CARR, J. G. (Eds.). **Microbiology in Agriculture, Fisheries and Food**. New York: Academic Press, p. 181-195, 1976.

BARROS, L. M. O. **Avaliação bacteriológica de ostra, *Crassostrea rhizophorae*, comercializada em Fortaleza, Ceará**. 2004. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Laboratório de Ciências do Mar. Universidade Federal do Ceará, 2004.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.3, n.1, p.1-20, jan. 2004.

BEUCHAT, I.R. Interacting effects of pH, temperature and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 25, n.5, p. 844-846, 1973.

BEUCHAT, I. R. *Vibrio parahaemolyticus* public health significance. **Food Technology**, Chicago, v. 36, n. 3, p.80-83, 1982.

BERRY, E. D.; FOEGEDING, P. M. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 10, p. 1256-1258, out. 1997.

BURNHAM, V. E. **Strain to strain differences in the growth, survival and adaptation of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in broth**. 2006. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Louisiana State University, 2006.

CAMPBELL, L. L.; WILLIAMS, O. B.; The bacteriology of gulf cost shrimp. IV Bacteriological, chemical and organoleptic changes with ice storage. **Food Technology**, Chicago, v. 6, p. 125-126, 1952.

CASTELLO, J.P. Reflexões sobre a pesca no Brasil em 2002. **Revista ABCC**, Recife, v. 5, n.1, p. 74, 2003.

COOK, D. W. et al. Molluscan, shellfish: oysters, mussels and clams. In DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.), **Compedium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA, p. 507-514, 2001.

COWELL, R. R.; HUQ, A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In: WACHSMUTH I.K.; BLAKE, P. A. (Eds). **Vibrio cholerae: molecular and global perspectives**. Washington: American Society for Microbiology, 1994.

DALL, W. et al. **Advances in Marine Biology**. New York: Academic Press, v. 17, 1999.

DISNEY, J. G. The spoilage of fish in the tropics. In: ANNUAL TROPICAL FISHERIES TECHNOLOGICAL CONFERENCE,1., Corpus Christi, USA. **Proceedings...** Corpus Christi, USA, p. 121-126, 1976.

DSMZ. **Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – Vibrio**. Disponível em: <<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/vibrio.html>> Acesso em: 1 abr. 2007.

EUGÊNIO, C. **Camarão: Ceará tenta reverter queda nas exportações**. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/noticias/detalhes>> Acesso em: 13 mar. 2005.

FAO. **La producción mundial de pescado, crustáceos y moluscos llegó a...** Disponível em: <<http://fao.org/fi/trends/worldprod99s>> Acesso em: 18 mai. 2004.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Food Microbiology**. 4th ed. New York: Mc Graw-Hill, p. 430-443, 1988.

FUJINO, T., G.; SAKAGUCHI, R.; SAKAZAKI, R. **International symposium on Vibrio parahaemolyticus**. Tokyo: Saikon, 1974.

GOMEZ-GIL, B. et al. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. **Microbiology**, New York, v.150, p.1769-1777, 2004.

GOOCH, J. A. et al. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in Postharvest American oysters. **Journal of Food Protection**, Des. Moines, v. 65, n.6, p. 970-974, jun. 2002.

GOUNOT, A. M. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 71, p. 386–397, 1991.

HAYAT MAHMUD, Z. et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel Japan. **Microbiological Research**, Jena/Germany, v. 161, n. 1, p. 25-37, 2006.

HERBERT, R. A. Microbial growth at low temperature. In: GOULD, G. W. (Ed.) **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Elsevier Applied Science, p. 71-96, 1989.

HILL, C.; O'DRISCOLL, B.; BOOTH, I. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. **Journal of Food Microbiology**, v. 28, p. 245-254, 1995.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil, de infecção gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14, p. 174-175, 1983.

HUNER, J. V.; BROWN, E. **Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States**. New York: An AVI Book, 1985.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.

KANEKO, T.; COWELL, R. R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. **Journal of Bacteriology**. United States, v. 113, n. 1, p. 24-32, jan. 1973.

KELL, D. B. et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, 73, n.2, p. 169-187, feb. 1998.

LALITHA, K.V.; SURENDRAN, P.K. Microbiological changes in farm reared freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) in ice. **Food Control**, Oxford, v.17, n. 10, p. 802-807, out. 2006.

LAMPRECHT, E. C. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* during freezing. **Journal Science Food Agricultural**, South Africa, v. 31, p. 1309-1312, 1980.

LAVILLA-PITOGO C. R.; LEAÑO E. M.; PANER, M. G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *Vibrios* in the rearing environment. **Aquaculture**, Amsterdam, v.164, n.1/4, p. 337-349, may. 1998.

LIGHTNER, D. V. Diseases of penaeid shrimp. In: MCVEY, J. P. (Ed.) **Handbook of Mariculture**. 2nd ed. Boca Ratón: CRC Press, p. 393-486, 1993. (Crustacean Aquaculture, 1).

LIMA DOS SANTOS, C. A. M., JAMES, D., TEUTSCHER, F., Guidelines for chilled fish storage experiments. **FAO Fisheries Technical Paper**, v. 22, p. 210, 1981.

LIMA, F. C. Víbrios marinhos: 1. *Vibrio parahaemolyticus*. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.11, n. 47, p. 14-22, 1997.

LISTON, J. *Vibrio parahaemolyticus*. In: CHICHESTER, C. O.; GRAHAM, H. D. (Eds.). **Microbial safety products**. New York: Academic Press, p. 203 – 213, 1973.

MACHADO, Z. L. **Camarão marinho: captura – cultivo – conservação comercialização**. Recife: SUDENE / PRN. p. 249, 1988.

MARTINS, P. C. C. **Influência das condições ambientais e das técnicas do manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará**. São Paulo: UFSC: Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, p. 117, 2003.

MC LAUGHLIN, J.B. et al. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 353, n.14, p.1463-1470, out. 2005.

MENEZES, F. G. R. **Diversidade de *Vibrio* em estuários do Estado do Ceará associada à atividade de carcinicultura**. 2005. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará. Instituto de Ciências do Mar – Labomar, Fortaleza, 2005.

MOLENDÁ, J. R. et al. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: Laboratory aspects. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v. 24, p. 444-448, 1972.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica, *Vibrio*, *Aeromonas* e *Plesiomonas***. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 30, p. 265-271, 2004.

NATIONAL Shellfish Sanitation Program. Manual of operations: sanitation of the harvesting, processing and distribution of shellfish. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1997. Part II.

NUNES, A. J. P. O cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* oligohalinas. **Revista Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, n. 66, p.15-19, jul./ago. 2001.

OLIVER, J. D. Formation of viable but nonculturable cells. In: KJELLBERG, S. (Ed.) **Starvation in bacteria**. New York: Plenum Press, 1995.

PALUMBO, S.A. Is refrigeration enough to restrain food-borne pathogens? **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 49, n. 12, p. 1003-1009, 1986.

PANICKER, G. et al. Detection of pathogenic species in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarray. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 7436-7444, 2004.

PANOFF, J. M. et al. Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IL1403. **Cryobiology**, San Diego, v. 32 n. 6, p. 516-520, dez. 1994.

PARVEEN, S. et al. Characterization of a clinical *Vibrio cholerae* O139 isolated from México. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p. 65-70, 2003.

PEREIRA, C. S; VIANA, C.M.; RODRIGUES; D.P. *Vibrio parahaemolyticus* produtores de urease isolados a partir de ostras (*Crassostrea rizophorae*) coletadas *in natura* em restaurantes e mexilhões (*Perna perna*) de banco natural. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.4, out./dez. 2004.

PROFROTA Pesqueira. **Relatório do grupo de trabalho interministerial encarregado de elaborar proposta do programa nacional de financiamento da ampliação e modernização da frota pesqueira nacional**. Disponível em: <<http://www.mercadodapesca.com.br/frame.php?pagina=http://200.198.202.145/seap/pec.htm>> Acesso em: 18 set. 2006.

RAVEL, J. et al. Temperature-induced recovery of *Vibrio cholerae* from the viable but non-culturable state: growth or resuscitation? **Microbiology**, London, v. 141, p. 377-383, Part.II, fev. 1995.

RAY B. Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 49, n. 8, p. 651-656, 1986.

RUSSELL, N.J. Bacterial membranes the effects of chill storage and food processing-an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 1/2, p. 27-34, 2002.

RUSSELL, N.J. et al. Membranes as a target for stress adaptation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.2, p. 255-261, 1995.

SAKAZAKI, R. *Vibrio* infestions. In: RIEMANN, H.; BRYAN, F. L. (Eds.) **Fooborne infections and intoxications**. New York: Academic Press, p. 173-209, 1979.

SAKAZAKI, R. *Vibrio parahaemolyticus* as a foodspoilage organism. In: ROSE, A. H. (Ed.) **Food Microbiology**. New York: Academic Press, p. 225-241, 1983.

SCHOBBER, J. Pesquisa impulsiona produção de camarões em viveiros e mercado de trabalho regional. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.54, n.1, p.10-11, jun./set., 2002.

SEGURANÇA alimentar - riscos biológicos – *Vibrio*: principais sintomas da intoxicação por *Vibrio. spp.* Disponível em: <<http://www.agenciaalimentar.pt/index.php?module=ContentExpress&func=display&btittle=CE&mid=&ceid=351>> Acesso em: 03 mar. 2007.

SEM, B. et al. The first outbreak of acute diarrhea due to a pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6. **International Journal of Infections Diseases**, Kolkata, v. 11, n. 2, p. 185-187, 2007.

SILLOS; FAGUNDES NETO. Foodborne – doenças veiculadas por alimentos – intoxicação alimentar. **The Eletronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases**, São Paulo, v. 8, n. 3, set. 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Detecção ou contagem de víbrios patogênicos. In: **MANUAL** de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, Cap. 15, p.111-124, 1997.

SOUSA, D. B. R. **Sobrevivência de *Vibrio parahaemolyticus* em camarão sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* estocado em temperaturas de resfriamento e congelamento.** 2003. 29f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

STANSBY, M.E. **Industrial fishery technology.** London: AVI, p. 393, 1968.

THOMPSON, R. J. et al. Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, p. 4103-4110, 2004.

TWEDT, R.M.; PEELE, J.T.; SPAULING, P.L. Effective ileal loop dose of Kanagawa-positive *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 40, p. 1012-1016, 1980.

VALENÇA, A. R.; MENDES, G. N. Cultivo de *Litopenaeus vannamei*: água doce ou oligohalina? **Revista Panorama da aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 78, 2003.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado.** São Paulo, Livraria Varela, p. 299, 2004.

WONG, H. C.; TING, S. H.; SHIEH, W. R. Incidence of toxigenic víbrios. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, p.197-202, 1992.

YAMAMOTO, T.; YOKOTA, T. Adherence targets of *Vibrio parahaemolyticus* in human small intestines. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 8, p. 2410-2419, ago. 1989.

YAP, W.G. The lowdown on world shrimp culture–II. **INFOFISH International**, Kuala Lumpur, v. 3, p. 20–27, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)