ROSELI PIMENTEL PINHEIRO E SILVA

FATORES INTERFERENTES NA FREQÜÊNCIA DA VIBRIOSE EM CAMARÃO MARINHO CULTIVADO (*Litopenaeus vannamei,* Boone 1931) NO LITORAL SUL DE PERNAMBUCO.

RECIFE

2007

ROSELI PIMENTEL PINHEIRO E SILVA

FATORES INTERFERENTES NA FREQÜÊNCIA DA VIBRIOSE EM CAMARÃO MARINHO CULTIVADO (*Litopenaeus vannamei,* Boone 1931) NO LITORAL SUL DE PERNAMBUCO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura.

Orientadora: Dra. Emiko Shinozaki Mendes
Depto. De Pesca e Aqüicultura da UFRPE.

Recife

Fevereiro de 2007

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

ROSELI PIMENTEL PINHEIRO E SILVA

Fatores interferentes na freqüência da vibriose em camarão marinho cultivado (L*itopenaeus vannamei,* Boone 1931) no litoral sul de Pernambuco.

Área de concentração: **Recursos Pesqueiros e Aqüicultura**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o (a) candidato (a) **ROSELI PIMENTEL PINHEIRO E SILVA** como aprovado (a).

Recife, 22 de fevereiro de 2007.

Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes (DSc, UFRPE)
Orientadora

Prof. Dr. Paulo de Paula Mendes (DSc, UFRPE)
Membro Interno

Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos (DSc, UFRPE)
Membro Externo

Dra. Alitiene Moura Lemos Pereira (Pesquisadora da Embrapa)
Membro Externo

DEDICATÓRIA

A Deus por seu infinito cuidado para comigo, por ter sido o firme alicerce da minha jornada...

...Aos meus queridos pais Amauri Pimentel e Verônica Tereza pelo amor dispensado e o apoio incondicional...

...Aos meus lindos irmãos, que mesmo distantes estiveram presentes nesta caminhada, Amauri Junior, Sara Pimentel e Leila Alves.

Amo vocês!!!!!

OFERECIMENTO

- A Deus pela onipresença e por ter me concedido forças para galgar mais um degrau na escada da vida;

- Aos meus pais que sonharam os meus sonhos sem se importarem com preço que isso lhes custariam. Aos meus irmãos que tão cedo saíram do meu convívio, porém sempre estiveram tão próximos. Eu os amo muito, vocês são a razão do meu viver;

- A professora Dra. Emiko Shinozaki Mendes, pessoa em quem busquei a inspiração para ser hoje a profissional que sou;

- Ao engenheiro de pesca Adriano Alvim Guaraná pela dedicação, apoio e incentivo quando tudo já parecia não ter mais sentido, muito obrigada por todo cuidado e carinho a mim dispensado;

- Aos meus amigos do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite – LICAL, por que sem a ajuda de vocês, esta conquista não teria se concretizado.

Faço minha, as palavras de Ayrton Senna, quando citou que "Vocês nunca saberão como um piloto se sente quando vence. O capacete oculta sentimentos inenarráveis". Toda minha gratidão e meu carinho a vocês que são exclusivos em minha vida, e que nem o tempo, nem à distância poderão afastá-los de mim. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

- A Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ter cedido sua infra-estrutura no desenvolvimento de todo o experimento além de seus profissionais que sempre estiveram prontos a me orientarem;
- A estimada professora Dra. Emiko Shinozaki Mendes, a quem sempre serei grata pela orientação e dedicação durante esses últimos cinco anos de minha vida;
- Aos mestres com quem pude sempre contar Dr. Paulo de Paula Mendes, Dr. Fernando Leandro dos Santos e Dr. George Chaves Jimenez. A vocês meus sinceros agradecimentos.
- Ao Departamento de Pesca e Aqüicultura e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura da UFRPE, por terem me recebido com apresso e estima.
- Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura da UFRPE, mestres que me auxiliaram e estimularam a prosseguir firme em busca dos meus objetivos;
- Aos médicos veterinários que compõem o LICAL, Lílian Maria Nery de Barros Góes, Carlos André Bezerra Alves, Karla Patrícia Brito de Araújo Vieira, Andréa Cristiane Barreto, Joanna Dourado, Dulcilene Lacerda, Márcia Freitas, Monique Monteiro Pinto, Giana Bastos, Paulo César Nunes Pereira do Rego.
- Aos futuros médicos veterinários que com tanto afinco abraçaram esse sonho meu, Simone Francisca Lira, Bruno Cerqueira, Luciana Coutinho, João Menezes, Priscila Daniella Marcelino Lima.
- Aos médicos veterinários que de alguma forma contribuíram na execução deste experimento e com os quais sempre pude contar Leonardo Gadelha Malta de Moura Filho, Rômulo Diniz Sobreira Filho, Clécio Florêncio, Verônica Arns da Silva, Virgínia Pedrosa, Suely Santos Bezerra.
- Aos profissionais Beatriz Regina de Oliveira Brito, Maria Risoleta, Ana Cynthia de Araújo Souza, Nikon Craveiro pelo engajamento e dedicação no desenvolvimento deste trabalho.
- Dona Márcia, Cleide, meus eternos agradecimentos, por todo apoio concedido.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Valores mínimos e máximos das contagens de *Vibrio* spp. em amostras coletadas em fazendas de cultivo de camarões marinhos..... 07

TABELA 2 Valores médios e intervalo de confiança das variáveis da qualidade da água monitorada nos viveiros de produção do camarão marinho (*L.vannamei*)..... 08

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Colônias de *Vibrio* spp. sacarose positivas..... 21

FIGURA 2 Colônias de *Vibrio* spp. sacarose negativas..... 21

RESUMO

Considerando as doenças como barreiras ao desenvolvimento da carcinicultura, a vibriose tem a possibilidade de ocorrer por ter como agente etiológico bactérias autóctones de ambiente marinho, objetivou-se a identificação dos fatores interferentes na freqüência desta enfermidade. Quatro fazendas situadas na costa sul de Pernambuco foram selecionadas das quais foram coletadas mensalmente amostras de água e camarão durante todas as fases de cultivo em dois diferentes ciclos climáticos (estio e chuvoso). Para estimar a carga de *Vibrio* spp., analisaram-se amostras de água, pós-larva, hemolinfa e hepatopâncreas e as contagens foram correlacionadas, pela utilização de modelos matemáticos ($P<0,05$), com as variáveis – estação do ano, variáveis físicas e químicas da água, exames a fresco e histopatológico, presença de toxinas e técnicas de manejo empregadas. Observou-se que apenas a variável tempo de cultivo interferiu na contagem total de *Vibrio* spp. As contagens variaram de 0 a 2,9 x 10^4 na água, 0 a 2,1 x 10^5 na pós-larva, 0,1 x 10 a 1,1 x 10^5 na hemolinfa e 7,0 x 10 a 1,1 x 10^6UFC/mL/g no hepatopâncreas. A carga de vibrionáceos aumenta com tempo de cultivo, e não sofre influência das variáveis físicas e químicas da água, do manejo e da presença de toxinas.

Termos para indexação: Víbrio, *Litopenaeus vannamei*, enfermidades, tempo de cultivo.

ABSTRACT

Considering the illnesses are barriers for the development of the carcinicultura, the vibriose has the possibility to occur for having as etiologic agent bacteria autochtonous of marine environment, it was objectified identification of the interferentes factors in the frequency of this disease. Four situated farms in the south coast of Pernambuco had been selected of which samples of water and shrimp during all had been collected monthly the phases of culture in two different climatic cycles (wet and rainy). Esteem the load of Vibrio spp., samples of water, post larvae had been analyzed, hemolymph and hepatopancreas and the countings had been correlated, through the use of mathematical models ($P<0,05$), with the variable - physical and chemical of the water, season, microscopical observation, histopathology, presence of toxins and production management methods. With it was observed that only the changeable time of culture intervened with the total counting of Vibrio spp. The counts varying from 0 to $2,9 \times 10^4$ in the water, from 0 to $2,1 \times 10^5$ in post larvae, from $0,1 \times 10$ to $1,1 \times 10^5$ in hemolymph and from $7,0 \times 10$ to $1,1 \times 10^6$UFC/mL/g in the hepatopancreas. The load of vibrionáceos increases with cycle duration, and it does not suffer influence from the variable physical and chemical of the water, of the handling, of the toxin presence.

Index terms: Vibrio, *Litopenaeus vannamei*, disease, production cycle duration

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS vi
LISTA DE FIGURAS vii
RESUMO viii
ABSTRACT ix

1. INTRODUÇÃO 12

2. OBJETIVOS
Geral..... 14
Específicos..... 14

3. REVISÃO DE LITERATURA
3.1. Produção do camarão marinho cultivado..... 15
3.2. Relação hospedeiro-patógeno-ambiente..... 16
3.3. Qualidade da água na carcinicultura..... 17
3.4. Importância do exame clínico..... 18
3.5. Microbiota de viveiros de cultivo..... 18
3.6. Relevância dos víbrios na carcinicultura..... 19
3.7. Toxinas oriundas de microalgas..... 22

4. APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO
Resumo..... 01
Abstract..... 01
Introdução..... 02
Material e Métodos..... 03
Resultados e Discussão..... 06
Conclusões..... 11
Referências..... 11

5. REFERÊNCIAS 40

6. ANEXOS..... 45

1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura nos primórdios da atual década foi uma das atividades do agronegócio mais lucrativas no âmbito mundial. No Brasil, o cultivo de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*, representa uma nova ordem econômico-social no litoral brasileiro. Neste contexto é importante ressaltar que a carcinicultura reveste-se de grande importância econômica, principalmente na região Nordeste, que detém a liderança da produção nacional e é a maior exportadora do produto no Brasil.

O rápido crescimento, porém desordenado, de uma atividade proporciona o surgimento de uma série de problemas. Em se tratando da carcinicultura, seu elevado crescimento gerou aumento na oferta do produto a nível mundial, o que culminou com a queda nos preços. Soma-se ainda o incremento nos custos de produção, além do surgimento de enfermidades.

Considerando que a criação de qualquer espécie animal deve abranger, pelo menos, quatro áreas básicas: reprodução, nutrição, genética e sanidade, verifica-se que nem todas as áreas se encontram bem contempladas para esta atividade.

A exemplo da existência de lacunas nos cultivos de camarão, os problemas sanitários estão hoje evidentes e sabe-se que quase sempre atrelados a falhas de manejo. Quando não são seguidas práticas de manejo sustentável há a incidência de enfermidades. A saúde dos animais cultivados é o resultado de sua interação com o ambiente e os microrganismos naturalmente inseridos naquele ecossistema.

A garantia da sanidade dos camarões cultivados envolve várias práticas com vistas à manutenção da qualidade da água e a redução do estresse dos animais, o que poderia favorecer o desencadeamento de enfermidades causadas patógenos oportunistas. Neste contexto, os víbrios assumem relevância, uma vez que, estes microrganismos são os principais responsáveis por infecções secundárias em camarões cultivados. Todavia, convêm ressaltar que os víbrios são bactérias que naturalmente habitam ecossistemas aquáticos e se

encontram amplamente distribuídos por todo mundo, predominando em ambientes costeiros e estuarinos de zonas temperadas ou tropicais quentes.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar os fatores que interferem na ocorrência da vibriose em camarões marinhos cultivados.

2.2. ESPECÍFICOS

2.2.1. Estimar a carga de *Vibrio* spp. presente na água de cultivo e no camarão;

2.2.2. Correlacionar o tempo de cultivo com a carga de vibrio, na água dos viveiros e no camarão;

2.2.3. Relacionar as técnicas de manejo com a ocorrência de víbrios, através da realização de inquéritos;

2.2.4. Associar os parâmetros físicos e químicos da água de viveiros, com a ocorrência de víbrios;

2.2.5. Correlacionar a presença de toxinas, oriundas das microalgas, com a vibriose;

2.2.6. Associar os resultados obtidos na bacteriologia com os do exame a fresco e concomitantemente com os resultados histopatológicos quanto à pertinência da vibriose.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção do camarão marinho cultivado

A aqüicultura é uma atividade que vem apresentando importantes e elevados índices de produtividade. A nível mundial, a produção no ano de 2004 atingiu valores de 1.387.215 t. O Brasil contribuiu com cerca de 5% desta produção (75.904 t) de acordo com os dados estatísticos da Food Agriculture Organization (FAO, 2006).

Na América do Sul, no ano de 2004, foram produzidos 172.105 t, da qual o Brasil, por sua vez, contribuiu com 44% desta produção. No ranking brasileiro, a região Nordeste assume o primeiro lugar, detendo 93% desta produção. Nesta região, a atividade promoveu a geração de 1,89 empregos diretos e 1,86 indiretos, chegando a um total de 3,75 empregos gerados por hectare, bem superiores ao máximo de 2,14 empregos por hectare na agricultura irrigada (SAMPAIO e COSTA, 2003).

Segundo Rocha e Rodrigues (2003), o Brasil, a nível de cenário global, no ano de 2002, despontou como o sétimo maior produtor mundial de peneídeos e o primeiro no tocante a produtividade na carcinicultura.

A região Nordeste, no ano de 2003, detinha cerca de 91% dos produtores brasileiros, com uma área de 14.824 ha e uma produção de 90.100 t. Diante deste cenário, a carcinicultura assumiu o segundo lugar entre as exportações do setor primário desta região, conforme Maeda (2002).

O litoral do estado de Pernambuco, situado na região Nordeste do Brasil, abrange 21 municípios distribuídos numa faixa de 187 Km, estendendo-se desde o município de Goiana, ao norte, até o município de São José da Coroa Grande, ao sul. Esta faixa litorânea é caracterizada, por apresentar: uma costa baixa, atingindo em vários pontos, cotas inferiores ao nível de preamar; um ecossistema extremamente produtivo, sendo considerada a região verde onde, ora se sucedem e ora se entrelaçam segmentos de planície recobertos por coqueirais,

remanescentes de mata atlântica, restingas, estuários com extensos manguezais, recifes de coral, coroas, ilhas entre outros (MANSO, 2003).

No ranking brasileiro, este Estado assume atualmente a quarta posição em produção, possuindo cerca de 98 produtores, sendo destes 88 de pequeno porte (até 10 ha), sete de médio porte (10 a 50 ha) e três de grande porte (>50 ha), perfazendo uma área de 1.108 ha de viveiro, conforme dados da ABCC (2005).

No tocante ao volume de exportações de camarão congelado, dados do Sistema Integrado de Comércio Exterior (SISCOMEX), apontam que Pernambuco, nos meses de janeiro a junho de 2006, exportou cerca de 1.821 t. Valor este, que vem apresentando gradual declínio desde o ano de 2004 (ABCC, 2006).

No Brasil, em 2004, a produção do camarão foi de aproximadamente 80.000 t, cerca de 10.000 t a menos que o ano anterior. Este decréscimo decorreu de problemas com barreiras comerciais e declínio da produção pela ocorrência de doenças, o que culminou com queda nas exportações (SALES et al., 2005). Todavia, a atividade continuou declinando, apesar dos autores afirmarem que a expectativa era de que no ano 2005 a atividade retomasse o crescimento dos anos de 2000 a 2002.

Maeda (2002) referenciou que a não recuperação dos preços internacionais, a mudança da situação cambiária, a valorização do real, o processo de *dumping* por parte dos americanos e o surgimento de enfermidades, contribuíram para a súbita perda da dinâmica da indústria camaroneira no Brasil.

3.2. Relação hospedeiro-patógeno-ambiente

Romero et al. (2003) citaram que acompanhando a intensificação da produção aqüícola está o desenvolvimento de problemas ecológicos e patológicos. Zanolo (2006), por

sua vez, referenciou a aqüicultura como uma atividade que, semelhantemente às outras (pecuária, avicultura e suinocultura), está susceptível a doenças dos animais.

Um manejo sanitário eficiente é realizado se conhecendo e considerando a inter-relação existente entre o hospedeiro, o ambiente e o patógeno. Segundo Galli (2004), qualquer alteração no equilíbrio a favor de algum deles pode determinar o aparecimento de uma enfermidade, ou seja, variações ambientais podem afetar tanto o hospedeiro quanto o patógeno.

Para lograr êxito num controle sanitário é necessário o prévio conhecimento do estado de saúde dos animais na área de cultivo, baseado em inspeções e padronização de procedimentos de amostragem, seguidas de diagnóstico laboratorial, de acordo com as normas internacionais (MACIEL et al., 2003).

3.3. Qualidade da água na carcinicultura

A carcinicultura é uma atividade de significativa complexidade, pois a mesma envolve muitas variáveis. Conforme Mendes (2001), são requeridas nessa atividade mais pré-requisitos técnicos e intrínsecos do que em outras atividades, principalmente, por ter no elemento água os primórdios da subsistência dos animais cultivados.

A garantia de boas condições ambientais durante o cultivo está intimamente relacionada com a qualidade da água, é devido a esta relação que seus parâmetros devem ser rotineiramente monitorados. Segundo Fonseca e Rocha (2004), a manutenção dos níveis ideais da qualidade da água é de extrema importância para evitar o aparecimento de doenças nos animais em cultivo.

Villalón (1991) considerou que o principal propósito em se manejar a qualidade da água de qualquer sistema de cultivo é regular e manter ótimas condições para o crescimento dos organismos. A qualidade da água é um fator determinante para a sobrevivência e

crescimento dos camarões cultivados. Mais que qualquer outro fator, os parâmetros hidrológicos influenciam em todas as atividades dos organismos (alimentação, respiração, reprodução, crescimento e estado imunológico).

3.4. Importância do exame clínico

Um recurso de grande valia e largamente empregado são as análises a fresco, que viabilizam a avaliação e o monitoramento da saúde dos camarões, podendo ser realizado tanto a campo quanto num laboratório, conforme de Pereira e Santos (2003).

O exame clínico fundamenta-se na observação visual e *in situ* de exemplares vivos ou moribundos, podendo, depois de se proceder o sacrifício dos animais, ser realizado um estudo mais detalhado, visando a indicação da presença de alterações (GAMEZ, 2001).

Os exames a fresco de amostras ao microscópio, das brânquias, apêndices orais, animais completos, como larvas e pós-larvas, hemolinfa, fragmentos de alguns tecidos e órgãos, são muito úteis para demonstração de algumas enfermidades bacterianas, micóticas e parasitárias (HERZBERG, 1996).

3.5. Microbiota dos viveiros de cultivo

Na aqüicultura, atividade em que um grande número de animais é mantido num espaço limitado, o aparecimento de enfermidades tem sido amplamente favorecido pelas condições das instalações, manejo e abastecimento de água dentre outros fatores (SUBASINGHE et al., 1998).

Entre as principais causas de perdas na larvicultura de peneídeos estão aquelas de origem bacteriana. A promoção de um ambiente benéfico e bacteriologicamente estável são de fundamental importância para um cultivo bem sucedido (LORENZO, 2004).

As bactérias desempenham importante papel como agentes desencadeadores de infecções secundárias, atuando como fator agravante em caso de ocorrência de doenças de outras etiologias, como, por exemplo, as viroses, como citaram Barbieri Jr. e Ostrensky Neto (2002).

De acordo com Maeda (2002), as bactérias normalmente encontradas na aqüicultura são pertencentes aos gêneros: *Vibrio, Pseudomonas, Flavobacterium, Pseudoalteromonas* e *Acinetobacter*.

São comuns em cultivos de larvas os problemas atrelados a infecção bactériana. Segundo Lorenzo (2004), larvas sob fadiga por manuseio inadequado, nutrições deficientes ou ainda pela má qualidade de água, estão vulneráveis a desenvolverem enfermidades de origem bacteriana.

3.6. Relevância dos víbrios na carcinicultura

As bactérias do gênero *Vibrio* são próprias de ecossistemas aquáticos, quer de origem marinha e/ou estuarina, ocorrendo em camarões de vida livre ou ainda nos cultivados (VANDERZANT et al., 1971). Ruangpon e Kitao (1991) citaram que os víbrios são incriminados como sendo os principais responsáveis pela maior parte das infecções bacterianas ocorridas nos camarões.

Conforme Lightner (1993), os víbrios são, em geral, bactérias de maior relevância na aqüicultura, devido a sua capacidade de infectar organismos aquáticos como os camarões peneídeos. Além dessas, os peixes (AUSTIN e AUSTIN, 1999), os moluscos (RHEINHEIMER, 1992) também podem ser infectados por eles.

Os *Vibrio* spp., designados comumente como patogênicos nem sempre o são. Na maioria das estirpes ambientais faltam os fatores de colonização necessários para a aderência e penetração, toxinas apropriadas ou outros determinantes da virulência necessários para

causar a doença. Recentemente foi demonstrado que os víbrios são capazes de responder a condições adversas, entrando numa fase viável, mas não "cultivável". Quando atingem essa fase, por uma estratégia de sobrevivência, as células mantém sua atividade metabólica, porém não são cultiváveis pela microbiologia clássica (LLEÒ et al., 2001).

Maeda (2002) discorrendo sobre os víbrios, referencia-os como patógenos oportunistas, que se proliferam rapidamente em função de sua habilidade de adaptação a baixos teores de oxigênio. Padilha (2005) destacou que a característica mencionada é com freqüência observada nos viveiros mal manejados, por isso são observados freqüentemente animais doentes.

Quanto às características halofílicas, as espécies patogênicas de víbrio ocorrem mais comumente em águas cuja salinidade se situa entre 0,5 a 30 (TISON e KELLY, 1986; WEST, 1989). Contudo, em ambientes de água doce, a baixa salinidade é compensada pela interação entre a temperatura elevada e concentração de nutrientes presente na mesma, conforme DePaola (1981).

Em laboratório para a realização do isolamento e identificação do vibrio, é inicialmente empregada a verificação da fermentação da sacarose. Alguns víbrios possuem a capacidade de fermentar a sacarose quando inoculados em Ágar Tiossulfato Citrato Sais de Bile (TCBS), sendo as colônias identificadas pela coloração amarela (Figura 1). Enquanto que as que não fermentam a sacarose são macroscopicamente identificadas pela sua coloração verde (Figura 2). Algumas espécies de víbrios podem ainda apresentar as duas colorações, em uma mesma colônia sendo capazes de fermentar "parcialmente" a sacarose, além de outras espécies poderem apresentar sorovares sacarose positiva e sorovares sacarose negativa. É importante ressaltar que esta capacidade de fermentar ou não a sacarose não está relacionada com a patogenicidade da bactéria e, portanto, a presença de um tipo ou de outro não indica a gravidade da situação (MENDES et al., 2005).

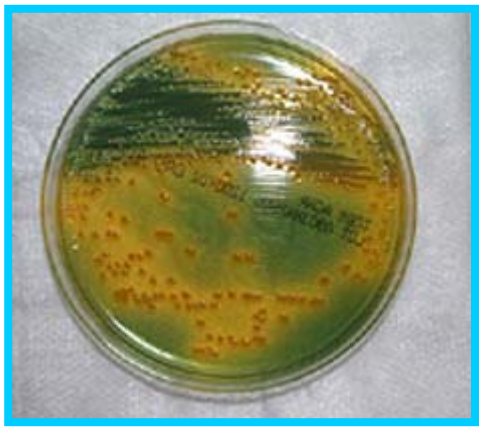

Figura 1. Colônias de *Vibrio* spp. sacarose positivas.

Figura 2. Colônias de *Vibrio* spp. sacarose negativas.

Os fatores de virulência das bactérias do gênero *Vibrio* incluem alguns elementos importantes que têm sido identificados, podendo se destacar as proteases alcalinas, as metalo proteases, as cisteína proteases e as proteases alcalinas séricas (AGUIRRE-GUZMÁN et al., 2004).

A vibriose pode ser caracterizada tanto como uma infecção localizada quanto sistêmica (generalizada) afetando todos os órgãos e tecidos (ROQUE et al., 2001). A forma assinalada como sistêmica, é uma enfermidade secundária a condições de estresse. As infecções locais ou cuticulares são observadas como manchas marrons ou pretas em resposta a uma possível agressão, de acordo com Galli et al. (2001). Referenciando ainda o mesmo autor, as lesões superficiais são eliminadas no momento da realização da ecdise, todavia, se estas lesões forem profundas, este quadro pode se complicar numa vibriose sistêmica.

Quando as bactérias são expostas a condições adversas de salinidade, temperatura ou privação de nutrientes podem ser danificadas reversivelmente e já não podem ser detectadas pelos métodos bacteriológicos padrão. Contudo, quando lhes são proporcionadas as condições ótimas para a sua proliferação, podem voltar ao estado “cultivável” normal (BYRD et al., 1991).

Um aumento no número de *Vibrio* spp. associado a uma significativa mudança na composição da comunidade de víbrios na água de viveiros são suficientes para desencadear a ocorrência de vibrioses (SUNG et al., 1999). Ainda que no ambiente de cultivo estejam presentes outros microrganismos que realizem a assimilação de rações excedente, excrementos, metabólitos nitrogenados, restos de plâncton e outros dejetos (BOYD, 2004) e estes microrganismos sejam competidores dos víbrios, podem os mesmos ainda ser desfavorecidos quando os víbrios se encontrarem em número elevado.

Fatores estressantes que podem advir da própria água de cultivo, quando ocorrem alterações das propriedades físico-químicas, como a temperatura, salinidade e pH, podem desencadear o desequilíbrio do ambiente, levando o animal a uma maior vulnerabilidade a doenças. Estas podem ser decorrentes do oportunismo de microrganismos, normalmente, presentes na microbiota ambiental, como citado por Lightner (1993).

Durante todo o cultivo de camarões marinhos, os víbrios podem interferir na produção e estes quando associados às condições de desequilíbrio, podem se tornar verdadeiros obstáculos ao sucesso da criação (RIBEIRO, 2005). O víbrio está amplamente distribuído em todo o mundo, quer em estuários, águas costeiras ou ainda nos crustáceos marinhos. Assim, a vibriose pode ocorrer em todos os peneídeos quando estes forem submetidos a situações de estresse (BROCK e MAIN, 1994; LIGHTNER, 1996; BOWER, 1997).

3.7. Toxinas oriundas de microalgas

As microalgas têm exercido importante interesse econômico em se tratando de alimentação para diversos organismos aquáticos. Apesar de servirem de alimento, são também utilizadas na manutenção da qualidade da água por exercerem influência no balanço do oxigênio, do dióxido de carbono e dos compostos nitrogenados e fosforados (DERNER et al., 2006).

Existem cerca de 300 espécies de microalgas, sendo a quarta parte destas consideradas nocivas, por possuirem a capacidade de produzir toxinas ou ainda provocar algum dano ao organismo vivo ou ao meio ambiente. As microalgas planctônicas e bentônicas são as principais fontes de biotoxinas (SCHRAMM e PROENÇA, 2005).

Consoante com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2000) as cianobactérias, por sua vez, se constituem como microrganismos procarióticos autotróficos, também denominados como cianofíceas (algas azuis), capazes de ocorrer em qualquer manancial superficial especialmente naqueles com elevados níveis de nutrientes - nitrogênio e fósforo – podendo produzir toxinas com efeitos adversos à saúde.

Diversos gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações são capazes de produzir diferentes metabólitos secundários. Alguns destes metabólitos possuem ação tóxica, tal como a cianotoxina. As cianotoxinas possuem ação rápida e são identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras que atuam mais lentamente são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos (MENDONÇA, 1990).

As toxinas produzidas por estes organismos apresentam efeitos adversos à saúde por ingestão, incluindo: as microcistinas, que são hepatotoxinas heptapeptídicas cíclicas, com potente efeito de inibição de proteínas fosfatases dos tipos 1 e 2A e promotoras de tumores; as cilindrospermopsina, alcalóides guanidínicos cíclicos, inibidores da síntese protéica, predominantemente hepatotóxico, apresentando também efeitos citotóxicos nos rins, baço, coração e outros órgãos; e as saxitoxinas, grupo de alcalóides carbamatos neurotóxicos produzido por cianobactérias, não sulfatados (saxitoxinas) ou sulfatados (goniautoxinas e C-toxinas) e derivados de carbamil, apresentando efeitos de inibição da condução (MAPA, 2000).

É crescente a utilização dos testes de toxicidade aquática visando determinar os efeitos deletérios nos organismos aquáticos, conforme Ferreira (2002). A exposição a um

determinado agente tóxico pode ser aguda ou crônica, caracterizando-se como aguda quando em um único evento a dose letal do tóxico é liberada e crônica quando doses subletais são liberadas em eventos repetidos por um determinado período de tempo (SCHVARTSMAN, 1991).

Na realização de um teste de toxicidade aguda são avaliados a mortalidade ou a sobrevivência dos organismos, alterações comportamentais (forma de natação, distribuição na coluna d'água, paralisação, letargia) e os aspectos biométricos, como o ganho de peso e crescimento (FERREIRA, 2004). Por sua vez, concentrações subletais de produtos tóxicos no ecossistema aquático não resultam necessariamente em mortalidade imediata dos organismos, porém muitas vezes provocam inúmeras disfunções fisiológicas, conforme relatado por Omoregie et al. (1994).

As toxinas, em sua grande variedade, podem ser secretadas ao meio externo – exotoxinas ou permanecerem dentro da célula bacteriana – endotoxinas. As exotoxinas são pertencentes ao grupo de toxinas A-B, onde a subunidade B é responsável pela fixação no receptor celular e a A, por sua vez, é quem atua no mecanismo da toxicidade, por possuir ação enzimática (GALLI et al., 2001).

Contudo, diante das árduas dificuldades para a carcinicultura, torna-se evidente a necessidade de maiores estudos a respeito das enfermidades que acometem camarões marinhos cultivados no nordeste brasileiro. Além disto, o desenvolvimento de bancos de dados que referenciem valores padrões para patógenos oportunistas, normalmente presentes no ambiente, poderá viabilizar a detecção precoce de situações de risco para os animais, possibilitando, a adoção de um manejo profilático eficiente e controle das enfermidades.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa dissertação é apresentada no artigo intitulado **"FATORES INTERFERENTES NA FREQÜÊNCIA DA VIBRIOSE EM CAMARÃO MARINHO CULTIVADO (*Litopenaeus vannamei,* Boone, 1931) NO LITORAL SUL DE PERNAMBUCO".** (manuscrito), que se encontra doravante anexado.

“FATORES INTERFERENTES NA FREQÜÊNCIA DA VIBRIOSE EM CAMARÃO MARINHO CULTIVADO (*Litopenaeus vannamei,* Boone, 1931) NO LITORAL SUL DE PERNAMBUCO”.

Manuscrito a ser submetido à revista
Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB
ISSN 1678-3921.

Fatores interferentes na freqüência da vibriose em camarão marinho cultivado no litoral sul de Pernambuco

Roseli Pimentel Pinheiro e Silva[1], Emiko Shinozaki Mendes[2], Paulo de Paula Mendes[2], Carlos André Bezerra Alves[3] e Lílian Maria Nery de Barros Góes[4].

[1]Médica veterinária, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura- UFRPE [2] Professor adjunto da UFRPE. [3] Médico veterinário, mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária.-UFRPE. [4] Médica veterinária, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária.-UFRPE.
[1]Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros S/N, Dois Irmãos, Recife-PE. (roseli_pimentel@hotmail.com)

Resumo - Considerando a vibriose como uma barreira ao desenvolvimento da carcinicultura, objetivou-se a identificação dos fatores interferentes. Quatro fazendas situadas na costa sul de Pernambuco foram selecionadas das quais foram coletadas mensalmente amostras de água e camarão durante todas as fases de cultivo em dois diferentes ciclos climáticos (estio e chuvoso). Para estimar a carga de *Vibrio* spp., analisaram-se amostras de água, pós-larva, hemolinfa e hepatopâncreas e as contagens foram correlacionadas, através da utilização de modelos matemáticos (P<0,05), com as variáveis – físicas e químicas da água, estação do ano, exame a fresco, exame histopatológico, presença de toxinas e técnicas manejo empregadas. Em todas as amostras foi observado que apenas a variável tempo de cultivo interferiu na contagem total de *Vibrio* spp. Foram obtidas contagens que variaram 0 a 2,9 x 10^4 na água, 0 a 2,1 x 10^5 na pós-larva, 0,1 x 10 a 1,1 x 10^5 na hemolinfa e 7,0 x 10 a 1,1 x 10^6UFC/mL/g no hepatopâncreas. Conclui-se que a carga de vibrionáceas aumenta proporcionalmente com tempo de cultivo, em virtude do incremento de matéria orgânica.

Termos para indexação: víbrio, *Litopenaeus vannamei*, enfermidades, tempo de cultivo.

Interfering factors in vibriosis frequency in shrimp cultivated on the south shore of Pernambuco.

Abstract - Considering vibriose as a barrier to the development of the carcinicultura, objectified it identification of the interfering factors. Four situated farms in the south coast of Pernambuco had been selected of which samples of water and shrimp during all had been collected monthly the phases of culture in two different climatic cycles (wet and rainy). Esteem the load of Vibrio spp., samples of water, post larvae had been analyzed, hemolinfa and hepatopâncreas and the countings had been correlated, through the use of mathematical models (P<0,05), with the variable - physical and chemical of the water, season, microscopical observation, histopathology, presence of toxins and production management methods. In all samples we observed only production cycle duration as a factor accounting for vibrios spp total counts, varying from 0 to 2,9 x 10^4 in water, from 0 to 2,1 x 10^5 in post larvae, from 0,1 x 10 to 1,1 x 10^5 in hemolymph and from 7,0 x 10 to 1,1 x 10^6UFC/mL/g in hepatopancreas. As a conclusion, the vibrio load increases according to production cycle duration, correlated with the increase of organic matter that serves as a substrate for these bacteria.

Index terms: vibrio, *Litopenaeus vannamei*, disease, production cycle duration

Introdução

A aqüicultura consiste numa atividade que tem apresentado significativo crescimento, na ordem de 9,2%/ano, considerado significativo quando comparado a outras atividades, segundo dados da ABCC (2005). A atividade hoje bem difundida no Brasil, tem na região Nordeste cerca de 90% de sua produção. O estado de Pernambuco possui clima tropical e um ecossistema extremamente produtivo (Manso, 2003) o que possibilitou o desenvolvimento de uma carcinicultura rentável e promissora, com produção do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) assumindo atualmente a quarta posição da produção no Brasil (ABCC, 2005).

Com a massiva intensificação da produção, foi observado o surgimento de problemas ecológicos e sanitários, provocados pelo desequilíbrio na interrelação entre hospedeiro, ambiente e patógeno (Galli, 2004), culminando no aparecimento de enfermidade.

Dentre os diversos agentes etiológicos observados na aqüicultura, os víbrios têm emergido como importantes patógenos, merecendo destaque na carcinicultura (Sudheesh & Xu, 2001). Segundo Ruangpon & Kitao (1991), bactérias deste gênero são incriminadas como os principais responsáveis pela maior parte das infecções bacterianas. Apesar de fazerem parte dos ecossistemas aquáticos, podem acometer camarões, quer de vida livre ou os cultivados (Vanderzant et al., 1971).

Alguns autores têm relatado o isolamento de víbrios em camarões peneídeos sadios, o que faz com que a hipótese de que é um gênero de bactérias oportunistas naturais seja largamente aceito (Vandenberghe et al., 1999; Gomez-Gil et al., 1998). Leanõ et al. (1998) relataram que no hepatopâncreas de juvenis de *P. monodon* há uma predominância de bactérias do gênero *Vibrio.*

Todavia, para que a vibriose ocorra, Sung et al. (1999) relataram que deve haver um incremento no número de bactérias patogênicas de *Vibrio* spp. associado a uma significativa diminuição na diversidade da comunidade de víbrios nos viveiros. Essa infecção pode assumir

a forma localizada ou ainda septicêmica afetando todos os órgãos e tecidos (Roque et al., 2001).

Dentre as diversas espécies bacterianas que afetam os camarões destacam-se na fase larval o *V. harveyi* e *V. splendidus*, quando em fase de crescimento em viveiros, são normalmente infectados pelo *V. parahaemolyticus* e *V. penaeicida*, conforme referenciado por Ishimaru et al. (1995).

Embora inúmeros casos de vibriose venham sendo largamente reportados, o mecanismo de patogenicidade desta bactéria ainda é pouco compreendido. Todavia, há relatos de que microrganismos deste gênero acometem os camarões em todos os estágios de seu desenvolvimento, gerando perdas econômicas significativas (Aguirre-Guzmán et al., 2004).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os fatores que interferem na freqüência da vibriose em camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) no litoral sul do estado de Pernambuco.

Material e Métodos

As amostras foram coletadas de quatro fazendas de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, situadas no litoral sul do estado de Pernambuco. As propriedades selecionadas apresentavam diferentes portes, sendo uma pequena (até 10 ha), duas médias (10 a 50 ha) e uma grande (>50 ha). Após a anuência dos proprietários em participarem das avaliações, deu-se início as coletas de informações (levantamento de dados) e de material (exames/análises).

Em cada propriedade foi aplicado um questionário visando a obtenção de informações a cerca do manejo empregado, ressaltando-se as fases de berçário e de engorda. Entre as principais informações coletadas, destacam-se:

Berçário: origem das pós-larvas; data de estocagem; densidade utilizada; tempo de cultivo; alimento e alimentação; uso de drogas/fertilizantes; sobrevivência e peso médio final.

Engorda: estratégia de transferência; densidade de estocagem; alimento e alimentação; uso de bandejas; drogas/fertilização; renovação de água; monitoramento das variáveis físicas e químicas da água; utilização ou não de aeradores e procedimentos de biosseguridade.

Amostras de água e camarão foram mensalmente coletadas de dois viveiros de cada fazenda no período de novembro de 2005 a outubro de 2006, abrangendo dois ciclos, um na estação chuvosa (inverno) e outro na de estio (verão). As amostras de água foram acondicionadas em recipientes esterilizados e mantidas em caixas isotérmicas e assim encaminhadas ao laboratório, enquanto que os camarões depois de capturados foram transportados vivos, sob aeração, em sacos plásticos acondicionados em baldes de 20L..

Foram coletadas 66 amostras de água dos viveiros para a determinação das variáveis físicas e químicas. A determinação das concentrações de nitrato (NO_3), nitrito (NO_2), nitrogênio amoniacal total ($NH_3 + NH_4$), fosfato total (PO_4) e clorofila-a foram realizadas por métodos rotineiramente utilizados no Laboratório de Limnologia da UFRPE.

As variáveis de pH, temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade foram mensurados “in loco” através de equipamentos portáteis comercialmente disponíveis no mercado.

As amostras de camarão para a realização do exame a fresco, foram encaminhadas ao Laboratório de Inspeção de Carne e Leite (LICAL) da UFRPE. A análise foi composta de dez camarões de cada amostra para observação dos órgãos e tecidos, na busca de alterações que poderiam ser sinais de início de doença. Os camarões foram pesados e posteriormente verificado o tempo de coagulação da hemolinfa de cada um. Retiraram-se os fragmentos de brânquias, hepatopâncreas, intestino, ceco posterior e músculo, para visualização ao microscópio óptico, seguindo as recomendações de Pereira & Santos (2003).

A análise histopatológica foi realizada seguindo as recomendações de Humason (1972) no Laboratório de Patologia Maria Ignez Cavalcante da UFRPE. Após o sacrifício por choque térmico, os camarões foram mergulhados ou infiltrados com solução Davidson´s

AFA, dependendo do tamanho dos animais. Posteriormente, foram transferidos ao álcool a 50%, diafanizados, incluídos em parafina e cortados a uma de espessura de 3 a 6 μm no micrótomo manual. As lâminas foram coradas utilizando-se hematoxilina e eosina e analisadas em microscópio óptico.

As análises microbiológicas, efetuadas no LICAL compreenderam a contagem total de *Vibrio* spp. no camarão (macerado de pós-larva, hemolinfa e hepatopâncreas) e na água, utilizado-se o meio de cultivo Ágar Tiossulfato Citrato Sais de Bile Sacarose (TCBS), de acordo com o método citado no FDA (1998).

Após a contagem das colônias, foram selecionadas aquelas com características do microrganismo alvo foram estocadas para serem submetidas a provas bioquímicas para a identificação da espécie, seguindo-se o método descrito pelo FDA (1998).

As coletas de água para a efetuação das análises toxicológicas foram realizadas em quatro pontos com garrafas coletoras: abastecimento, vala lateral, drenagem e zona morta. De cada ponto foram coletados um litro de sub-amostra e colocadas em um balde para homogeneização e posterior envase em garrafas plásticas de 500 mL e acondicionadas em caixas isotérmicas, sendo transportadas para o Laboratório de Farmacologia da UFRPE.

As análises pré-toxicológicas foram efetuadas tomando-se como referência os trabalhos de Chorus & Bartram (1999) e Rocha et al. (2000), objetivando-se manter a sensibilidade em se detectar a presença de toxinas importantes na água dos viveiros de cultivo de camarão, como também de utilizar um número bastante reduzido de animais de laboratório. O material biológico obtido, após um período de armazenamento prévio (5°C), era recondicionado e submetido à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante era então recolhido e alíquotas de 100 μL eram aplicadas em cada alça (20mm) de tecido ileal de animais previamente submetidos à procedimento cirúrgico mediados por associação de cloridrato de xilazina com cloridrato de ketamina.

Assim, após um período de 24 horas, os animais eram avaliados clinicamente e sacrificados (mediante aprofundamento da anestesia), sendo a cavidade abdominal aberta, para a observação do conteúdo das alças de tecido ileal. Quando necessário, o conteúdo era adequadamente recolhido e armazenado para posterior análise, como também eram repetidos os ensaios em que a resposta era positiva.

Para correlacionar a ocorrência de vibriose com as variáveis de produção, de manejo e ambientais, utilizou-se o seguinte modelo linear múltiplo:

$$\text{Vibriose}^{\lambda}_i = \beta_0 + \beta_1 TC\ \beta_2 NV_{TOTAL(Água)} + \beta_3 NV_{TOTAL(Camarão)} + \beta_4 Tox + \beta_5 EF + \beta_6 EH + \beta_7 FQ + \beta_8\ Quest + \beta_9 EA + e_i$$

Em que: λ-transformador de Box e Cox; i- i-ésima observação, β_0 , $\beta_{1,...,}$ β_8 - parâmetros do modelo, TC – tempo de cultivo, $NV_{TOTAL(Água)}$ - número de víbrios na água, $NV_{TOTAL(Camarão)}$ - número de víbrios no camarão, Tox- presença de toxinas, EF- exame a fresco, EH- exame histopatológico, FQ- variáveis físicas e químicas da água, Quest- questionário, EA- estação do ano, e_i- erro associado a cada observação.

Para relacionar as variáveis e/ou seus níveis, foi utilizado o processo de Stepwise, fazendo o lâmbda (λ) variar entre +2 a –2, em escala de 0,1 (Mendes, 1999). Para estimar os parâmetros (β_1, $\beta_{2,...}$, β_9) utilizou-se o programa computacional Syseapro versão-V.1.

Resultados e Discussão

Para as contagens de *Vibrio* spp., tanto na água de cultivo como nas pós larvas, hemolinfa e hepatopâncreas, foram observadas variações que são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores mínimos e máximos das contagens de *Vibrio* spp. em amostras coletadas em fazendas de cultivo de camarões marinhos.

Amostra	Valor mínimo (UFC/mL ou g)	Valor máximo (UFC/mL ou g)
Água	0,0 x 10	2,9 x 10^4
Pós-larvas	0,0 x 10	2,1 x 10^5
Hemolinfa	0,1 x 10	1,1 x 10^5
Hepatopâncreas	7,0 x 10	1,1 x 10^6

Ao correlacionar a vibriose com as variáveis inclusas no modelo, tais como: tempo de cultivo, número de víbrios presentes na amostra, presença de toxinas, exame a fresco, exame histopatológico, variáveis físicas e químicas da água, estação do ano e dados de manejo obtidos através de questionários, pôde-se evidenciar que apenas a variável tempo de cultivo estava atrelada a vibriose, sendo as demais não significativas ($P \geq 0,05$), portanto, excluídas do modelo. Verificou-se que a interação entre os vetores número de víbrio total (NVtotal) e tempo de cultivo (TC) foi significativa, obtendo-se as seguintes equações:

EQUAÇÃO 1: $NV_{TOTAL\ (Água)} = \dfrac{114,2329}{(1 - 0,0086 \times TC)}$ $R^2 = 99,55\%$

EQUAÇÃO 2: $NV_{TOTAL\ (Pl)} = \dfrac{8475,8129}{(1 - 0,0016 \times TC)}$ $R^2 = 79,21\%$

EQUAÇÃO 3: $NV_{TOTAL\ (Hemo)} = \dfrac{104,9176}{(1 - 0,0105 \times TC)}$ $R^2 = 99,88\%$

EQUAÇÃO 4: $NV_{TOTAL\ (Hepato)} = \dfrac{-5242,2024}{(1 - 0,0107 \times TC)}$ $R^2 = 99,36\%$

Em que: NV_{TOTAL} - Nº de *Vibrio* spp. presentes na água, pós larva, hemolinfa ou hepatopâncreas; TC - Tempo de cultivo.

Para todas as equações estimadas foi utilizado o teste de D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk (Zar, 1999) para verificar se as pressuposições de normalidade não foram violadas.

Foi observada uma tendência ao aumento na carga de vibrionáceos em função do tempo de cultivo para todas as amostras. Os resultados obtidos podem estar fundamentados no princípio de que com o aumento dos dias de cultivo há um acúmulo de matéria orgânica nos viveiros em função de excrementos dos animais, da decomposição de rações, da morte de algas, dentre outros, sendo essa matéria orgânica utilizada como substrato por bactérias do gênero *Vibrio*.

Em concordância com os resultados obtidos, Serra et al. (2003) citaram que a excessiva produção da biomassa primária, acúmulo de matéria orgânica no meio, pode favorecer ao desenvolvimento e a manutenção de espécies patogênicas de vibrio, além de outros microrganismos igualmente patogênicos.

Os resultados obtidos nas análises físicas e químicas da água não apresentaram nenhuma correlação com a ocorrência da vibriose. Os valores mínimos e máximos observados, bem como os aceitáveis e intervalo de confiança são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios e intervalo de confiança das variáveis da qualidade da água monitorada nos viveiros de produção do camarão marinho (*L.vannamei*).

Variável	Valor mínimo	Valor máximo	Valores aceitáveis	Intervalo de confiança
Clorofila (mg/L)	0	114	0,05 – 0,2	4,16 ± 4,6
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	0	0,08	< 0,1	0,0076 ± 0,0036
Nitrito (mg/L)	0	0,02	0,3	0,0013 ± 0,0007
Nitrato (mg/L)	0	0,29	0,2 – 10	0,0177 ± 0,0121
Fosfato inorgânico (mg/L)	0	0,14	0,005 – 0,2	0,0398 ± 0,0078
Sílica (mg/L SiO_2)	0	2,42	2 – 20	0,9139 ± 0,1473

Considerando aceitáveis as variações de concentração de substâncias inorgânicas dissolvidas nas águas de viveiros, referenciadas por Boyd (1990), tem-se que, todos os resultados obtidos, exceto a clorofila, encontram-se dentro do estipulado. O aumento da clorofila foi acompanhado pelo do fitoplâncton, como esperado, uma vez que existem métodos em que a biomassa fitoplanctônica é determinada mediante a análise de clorofila-a, por estarem diretamente relacionadas (Matthiensen et al., 1999).

A ausência de correlações entre a ocorrência de vibriose e as variáveis físicas e químicas da água, está relacionada com o fato de que estas apresentaram baixas amplitudes durante o período amostral.

Serra et al. (2003) ao avaliarem as relações existentes entre as variáveis oxigênio, temperatura, pH, salinidade e nutrientes com a presença do *V. parahaemolyticus* em águas do rio Anil-MA, obtiveram resultados que apresentaram pobres correlações. Segundo os autores, este fato foi decorrente da oscilação destes parâmetros terem ocorrido dentro da faixa de maior freqüência do microrganismo, o que não desfavoreceu sua presença no ecossistema.

Tanto os exames a fresco quanto o histopatológico, não apresentaram correlação com a vibriose, muito embora, tenham sido observadas, principalmente no período final do cultivo, contagens elevadas de *Vibrio* spp. Esse fato pode estar atrelado à forma com a qual estes dados foram ingressados no modelo, uma vez que se lançou mão do sistema binário. Assim sendo, resultados como a não repleção de lipídios nos túbulos do hepatopâncreas, por exemplo, não foram considerados como lesão característica de vibriose, fato que pode ter contribuído para a ausência de correlações.

Todavia, Alday-Sanz (1994) citou que enzimas digestivas presentes no hepatopâncreas funcionam como uma "peneira" que impedem a colonização das bactérias e que a ocorrência desta contaminação poderia ser decorrente de uma falha neste mecanismo.

Embora não exista um valor padrão para a contagem de víbrios nos camarões, tanto na hemolinfa quanto no hepatopâncreas foram registrados altos índices. Faz-se necessário ressaltar que a determinação da carga de víbrios não deve ser dissociada da anamnese dos animais, o que permitiria concluir um diagnóstico, apesar de Lightner (1977) ter citado que apenas a presença da bactéria na hemolinfa possibilita a caracterização de um diagnóstico sugestivo de septicemia.

As espécies identificadas foram *V. damsela* (5,0%), *V. anguillaum* (20,0%), *V. mediterranei* (5,0%), *V. proteolyticus* (3,3%), *V. fluvialis* (15,0%), *V. halioticoli* (3,3%), *V. harveyi* (3,3%), *V. carchariae* (8,0%), *V. alginolyticus* (3,3%), *V. fischeri* (5,0%), *V. holisae*

(3,3%), *V. vulnificus* (8,3%), *V. furnissii* (1,7%), *V. parahaemolyticus* (5,0%) *e V. cincinatiensis* (5,0%).

Não foi verificada uma faixa em que os animais apresentassem maiores mortalidades em função da carga de víbrios. Resultados diferentes foram obtidos por Vaseeharan & Ramasamy (2003) que ao realizarem a análise quantitativa de bactérias do gênero *Vibrio* nos viveiros, ao constatarem que quando as contagens atingiam valores de 2,0 x 10^2 UFC, observava-se significativa mortalidade nas larvas de camarões.

No tocante a estação do ano, não foram observadas correlações. Este fato se deve a baixa oscilação (5ºC), durante toda a fase experimental. Este fato justifica também a não correlação da ocorrência de vibriose com a presença de toxinas, pois Pádua (2002) referenciou que as cianobactérias, principal fonte de toxinas, apresentam maior desenvolvimento em temperaturas a partir de 15ºC. Ressalta-se que mesmo na estação chuvosa, a região onde estão localizadas as fazendas não atinge cotas tão baixas de temperatura, fazendo com que para esta variável não apresentasse diferença entre estações climáticas.

Foram verificados, pelos dados obtidos nos inquéritos, que as práticas de manejo empregadas não apresentavam muitas discrepâncias entre as propriedades envolvidas, situadas na mesma bacia hidrográfica apesar de serem de portes distintos. Desta forma, ao se correlacionar os resultados obtidos através dos questionários com a ocorrência de vibriose, constatou-se a sua não existência.

Conclusões

1. Diante do exposto, pôde-se observar que a carga de víbrio tanto na água de viveiros, como nas pós-larvas, hemolinfa e hepatopâncreas aumentam de acordo com o tempo de cultivo.

2. Constatou-se, nas condições deste experimento, que são fatores que não interferem na ocorrência da vibriose as técnicas de manejo, as variáveis físicas e químicas da água e a presença de toxinas.

3. Os exames a fresco e histopatológico, no presente experimento, não foram ferramentas que possibilitaram associações com a carga de *Vibrio* spp.

Referências

AGUIRRE-GUZMÁN, G.; RUÍZ, H.M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research** , v.35 , n. 15, p.1395-1404, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Censo 2004**. 2005. Disponível em: http://www.abccam.com.br. Acesso em 10 maio 2006.

ALDAY-SANZ, V. **Studies on the pathogenesis of *Vibrio* spp. Infection in *Penaeus monodon* Fabricius**. 1994. 152p. Tese (Pós-Doutorado) - Univ. of Stirling, Scotland.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Ala. Agr. Exp.Sta. Auburn: Univers. Alabama. 1990. 462p.

CHORUS, I; BARTRAM, J. Toxicity tests and bioassays, in Laboratory analysis of cyanotoxins, chapter 13. Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. **World Health Organization**. p.378-388. 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998.

GALLI, L. Manejo sanitário en el cultivo de camaron. In: Ranzani- Paiva, M.J.T. et al. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela. 2004. p.301-322.

GOMEZ-GIL, B.; TRON-MAYÉN, L.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F.; INGLIS, V.; GUERRA-FLORES, A.L. Species of Vibrio isolated from hepatopâncreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile Penaeus vannamei. **Rev. Aquaculture**. v. 163. p.1-9. 1998.

HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques.** 3ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA. 1972.

ISHIMARU, K.; AKAGAWA-MATSUSHITA, M.; MUROGA, K. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 45. p.134-138, 1995.

LEANÕ, E.M.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; PANER, M.G. Bacterial flora in the hepatopâncreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. **Rev. Aquaculture**. V. 164. p.367-374. 1998.

LIGHTTNER, D.V. Shrimp disease. Disease diagnosis and control in north American aquaculture. **Elsevier**, Amsterdam. p. 10-77. 1977.

MANSO, V.A.V. **Definição dos pontos de contorno da linha de preamar máxima atual do município de Ipojuca-PE.** 2003. Disponível em www.cprh.pe.gov.br/downloads/pnma2/relatorio-final.pdf. Acesso em: 10 out. 2006.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J.S.; CODD, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Rev. Brasil. Biol.** v.59, n.3, p.361-376. 1999.

MENDES, P.P. **Estatística Aplicada à Aquicultura.** Recife: Editora Bagaço. 1999.

PÁDUA, H.B. **Cianobactérias e outras intrigantes ocorrências em criações de organismos aquáticos.** 2002. Disponível em: http://www.setorpesqueiro.com.br. Acesso em: 07 dez. 2006.

PEREIRA, A.M.L.; SANTOS, M.L. **Relatório do treinamento em patologias de camarões marinhos.** Parnaíba; ITS, p.19-29. 2003.

ROCHA, M. F. G.; SILDRIM, J. J. C.; SOARES, A. M.; JIMENEZ, G. C.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Supernatants from Macrophages Stimulated with Microcystin-LR Induce Electrogenic Intestinal Response in Rabbit Ileum. **Pharmacology & Toxicology**. v.85: p. 2-6. 2000

ROMERO , F.R. et al. Estrategias de control de enfermedades en acuicultura. IN: **II CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA**. 2003. p. 624-654.

ROQUE, A.; MOLINA-AJA, A.; BOLÁN-MEJÍA, C.; GOMES-GIL, B. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern México. **Int. J. of Antimicrobial Agents**. v. 17. p.383-387. 2001.

RUANGPON, L.; KITAO, T. *Vibrio* bactéria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus vannamei* Fabricius. **J. Fish Disease**. v.14. .p.383-388. 1991

SERRA, C.L.M.; CAVALCANTE, P.R.S.; ALVES, L.M.C.; NASCIMENTO, A.R.; DINIZ, S.C.C.S. Avaliação de parâmetros físicos e químicos e pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em águas do estuário do rio anil (São Luís, Estado do Maranhão). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá. v. 25. n. 2. p. 261-266. 2003.

SUDHEESH, P.S.; XU, H.S. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. **Rev. Aquaculture**. v. 196. p.37-46. 2001.

SUNG, H.H.; LI, H.C.; TSAI, F.M.; TING, Y.Y. ; CHAO, W.L. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. **J. of Experimental Marine and Ecology**. v.236. p. 261-271. 1999.

VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; ROBLES-AROZARENA, R.; RIVERA, G.; BOLLAND, A.; BALLADARES, M.; GOMEZ-GIL, B.; CALDERON, J.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **App. and Envir. Microbiol**. v. 65. n. 6. p.2592-2597. 1999.

VANDERZANT, C; NICKELSON, R.; JUDKINS, P.W. Microbial flora of pond-reared brown shrimp (Penaeus aztecus). **Appl. Microbiol**. v.21. p.916-921. 1971.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Abundance of potentially pathogenic micro-organims in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. **Microbiol. Research**. v. 158. n. 4. p. 299-308. 2003.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. 4ªed. New Jersey. 1999. 663p.

5. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. **Censo 2004**. 2005. Disponível em: <http:://www.abccam.com.br.> Acesso em 10 mar. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. Estatística das exportações. **Rev. da ABCC**. n 2, p. 55-57, jun. 2006.

AGUIRRE-GUZMÁN, G.; RUÍZ, H.M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture Research** , v.35 , n. 15, p.1395-1404, dez. 2004.

ALDAY-SANZ, V. **Studies on the pathogenesis of *Vibrio* spp. Infection in *Penaeus monodon* Fabricius**. 1994. 152p. Tese (Pós-Doutorado) - Univ. of Stirling, Scotland.

AUSTIN, B., AUSTIN, D.A. **Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish.** Springer: London, 1999, 457p.

BARBIERI JÚNIOR, R.C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: engorda**. Viçosa: Aprenda Fácil. 2002, 370p..

BOWER, S.M. *Vibrio* spp. (Vibrio disease) of cultured shrimp. **Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish.** 1997. Disponível em <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/vibriasp-e.htm>. Acesso em: 10 out. 2006.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Ala. Agr. Exp.Sta. Auburn: Univers. Alabama. 1990. 462p.

BOYD, C.E. Uso de probióticos e qualidade da água e solo. **Rev. da ABCC**. n.2, p.67-69. jun. 2004.

BROCK, J.A.; MAIN, K.L. A guide to the cammon problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. **The oceanic institute**. Makapuu Point: Hawaii. 1994. 241 p.

CHORUS, I; BARTRAM, J. Toxicity tests and bioassays, in Laboratory analysis of cyanotoxins, chapter 13. Toxic cyanobacteria in water – A guide to their public health consequences, monitoring and management. **World Health Organization**. p.378-388. 1999.

DE PAOLA, A. *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: A literature review. **Int. J. Food. Sci. & Tech**. v.46. p.82-89. 1981.

DERNER, R.B. et al. Aplicações biotecnológicas das microalgas. **Rev. Panorama da Aqüicultura**. v.16, n.95, p.27-29, Maio/Jun. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Global Aquaculture Production.** 2006. Disponível em <http://www.fao.org.>Acesso em: 10 out. 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual.** 8. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998.

FERREIRA, C.M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã- touro (*Rana catesbiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas.** 2002. 109f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERREIRA, C.M. Análises complementares obtidas a partis de testes de toxicidade aquática**.** In: Ranzani- Paiva, M. J. T. et al. **Sanidade de organismos aquáticos.** São Paulo: Varela, 2004. p. 273-284.

FONSECA, C.; ROCHA, I.P. **Cartilha de boas práticas de manejo na fazenda para prevenir e controlar enfermidades do camarão *Litopenaeus vannamei* no Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/Cartilha%20IMNV.pdf> . Acesso em 16 dez. 2006. 62p.

GALLI, L. Manejo sanitário en el cultivo de camaron. In: Ranzani- Paiva, M.J.T. et al. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.301-322.

GALLI, L. et al. **I Curso básico de bacteriologia.** 2001. 42p.

GAMEZ, J.C.I. Manual de practicas de laboratório de sanidad de camarón. **Instituto Tecnológico de Sonora**. 2001. p. 18-23.

GOMEZ-GIL, B. et al. Species of *Vibrio* isolated from hepatopâncreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei.* **Rev. Aquaculture**. v. 163. p. 1-9. 1998.

HERZBERG, M.Z. Enfermidades mas frecuentes em cultivos regionales de camarón. **Centro de Ciências de Sinaloa**. 1996. p.1-12.

HUMASON, G.L. **Animal tissue techniques.** 3ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA. 1972.

ISHIMARU, K.; AKAGAWA-MATSUSHITA, M.; MUROGA, K. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 45. p.134-138, 1995.

LEANÕ, E.M.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; PANER, M.G. Bacterial flora in the hepatopâncreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. **Rev. Aquaculture**. v. 164. p.367-374. 1998.

LIGHTTNER, D.V. Shrimp disease. **Disease diagnosis and control in north American aquaculture**. Elsevier: Amsterdam. p. 10-77. 1977.

LIGHTNER, D.V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **Word aquaculture society.** Baton Rouge: Louisina. 1996. 304p.

LIGHTNER, D.V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In: J.P. McVey. CRC **Handbook of mariculture**. Crustacean aquaculture. Baton Rouge: CRC Press, v.1; p.393-486. 1993.

LLEÒ, M.M. et al. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. **J. of Applied Microbiology**. v.91; n. 6; p.1095-1102. 2001.

LORENZO, F. M. Produção pós-larval do camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Como a indústria de larvicultura respondeu aos desafios da década passada**. Rev. da ABCC**. n. 2, p. 26-34. 2004.

MACIEL, M. L. T. et al. Avaliação de riscos sanitários potenciais em cultivos do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no estado de Santa Catarina (Brasil). In: **II CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE AQÜICULTURA**. p. 223-230. 2003.

MAEDA, M. Microbial communities and their use in aquaculture. Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound a aquaculture production systems. **World Aquaculture Society**. Ceng-Shenglee: Pat O" Bryen. 2002. 187p.

MANSO, V.A.V. **Definição dos pontos de contorno da linha de preamar máxima atual do município de Ipojuca-PE.** 2003. Disponível em: <www.cprh.pe.gov.br/downloads/pnma2/relatorio-final.pdf.> Acesso em: 17 nov. 2006.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J.S.; CODD, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Rev. Brasil. Biol.** v.59, n.3, p.361-376. Out. 1999.

MENDES, E.S. et al. Os víbrios na carcinicultura. **Rev. Panorama da Aqüicultura**. v.15. n.91. p.26-29. Set/Out. 2005.

MENDES, P.P. **Cultivo de camarões marinhos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA. 2001. Porto Seguro. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca. p.78.

MENDES, P.P. **Estatística Aplicada à Aquicultura.** Recife: Bagaço. 1999.

MENDONÇA, S.R. **Lagoas de estabilização e aeradas mecanicamente: novos conceitos.** João Pessoa: Universitária. c.6, p.235-277. 1990.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA**. Portaria Nº 1469,de 29 de dezembro de 2000.** Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php> Acesso em: 12 dez. 2006.

OMOREGIE, E.; ESEYIN, T. G.; OFOJEKWU, P. C. Chronic effects of formalin on erythrocyte counts and plasma glucose of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Asian Fisheries Science**, n.7, p.1-6. Jun. 1994.

PADILHA, P.J.M. **Efeito da utilização de probiótico sobre aspectos microbiológicos e parâmetros de qualidade da água e produtividade em viveiros de cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.** 2005. 29f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Universidade de Santa Catarina, Santa Catarina.

PÁDUA, H.B. **Cianobactérias e outras intrigantes ocorrências em criações de organismos aquáticos.** 2002. Disponível em: <http://www.setorpesqueiro.com.br.> Acesso em: 07 dez. 2006.

PEREIRA, A.M.L.; SANTOS, M.L. **Relatório do treinamento em patologias de camarões marinhos.** Parnaíba: ITS, 2003. p.19-29

RHEINHEIMER, G. **Aquatic Microbiology.** Wiley: London. 1992. 363p

RIBEIRO, C.M.F. **Aspectos gerais da vibriose em camarão marinho.** 2005. 40f. Monografia (Especialização em biologia) Faculdade Frassinetti do Recife, Recife.

ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J. A carcinicultura brasileira em 2002**. Rev. ABCC**. n.1, p.30-45. 2003.

ROCHA, M. F. G.; SILDRIM, J. J. C.; SOARES, A. M.; JIMENEZ, G. C.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Supernatants from Macrophages Stimulated with Microcystin-LR Induce Electrogenic Intestinal Response in Rabbit Ileum. **Pharmacology & Toxicology**. v.85: p. 2-6. 2000

ROMERO, F. R. et al. Estrategias de control de enfermedades en acuicultura**. II CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA**. p. 624-654, 2003.

ROQUE, A. et al. In vitro susceptibilidade to 15 antibiotics of víbrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern México. **International Journal of Antimicrobial Agentes.** n.17, p. 383-387. 2001.

RUANGPON, L.; KITAO, T. *Vibrio* bactéria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus vannamei* Fabricius. **J. Fish Disease**. v.14. .p.383-388. 1991

SALES, D.S. et al. O desenvolvimento recente da aqüicultura brasileira. In: **ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA – ANUALPEC**. 2005. p.252-256.

SAMPAIO, Y.; COSTA, E. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão cultivado. **Revista da ABCC**. n. 1, p. 60-64, 2003.

SCHRAMM, M.A.; PROENÇA, L.A.O. Florações de algas nocivas e o risco das ficotoxinas em moluscos. Rev. Panorama da Aqüicultura. v.15. n 89, p.25-27. Maio/Jun. 2005.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. São Paulo: Sarvier. 1991. 355p.

SERRA, C.L.M. et al. Avaliação de parâmetros físicos e químicos e pesquisa de *Vibrio parahaemolyticus* em águas do estuário do rio anil (São Luís, Estado do Maranhão). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. Maringá. v. 25. n. 2. p. 261-266. 2003.

SUBASINQHE, R.P. et al. Suistainable shrimp culture development: bacteriological issues and challenges. **Advances in shrimp biotechnology.** Tailândia, p.13-18. 1998.

SUDHEESH, P.S.; XU, H.S. Pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus in tiger prawn Penaeus monodon Fabricius: possible role of extracellular proteases. **Rev. Aquaculture**. v. 196. p.37-46. Maio. 2001.

SUNG, H.H.; YANG, Y.L.; SONG, Y.L. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. **J. Crustac. Biol**. v.16. n. 2. p. 278-284. 1996.

SUNG, H.H. et al. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. **J. of Experimental Marine Biology and Ecology**. 236, p.261-271. 1999.

TISON, D. L.; KELLY, M. T. Virulence of *Vibrio vulnificus* strains from marine environment. **Appl. Environ. Microbiol.** v.51. p.1004-1006. Set. 1986.

VANDENBERGHE, J. et al. Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. **App. and Envir. Microbiol**. v. 65. n. 6. p.2592-2597. 1999.

VANDERZANT, C; NICKELSON, R.; JUDKINS, P.W. Microbial flora of pond-reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*). **Appl. Microbiol.** v.21. p.916-921. Maio. 1971.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Abundance of potentially pathogenic micro-organims in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. **Microbiol. Research**. v. 158. n. 4. p. 299-308. Dez. 2003.

VILLALÓN, J. R. **Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp**. NOAA/ ESDC: USA. 1991. 89p.

WEST, P.A. The human pathogenic *Vibrio* a public health update with environmental perspectives. **Epidemiol. Infect.** v.103. p.1-34. Ago. 1989.

ZANOLO, R. Enfermidades na aqüicultura: perspectivas e importância do uso de produtos veterinários registrados para a atividade. **Rev. da ABCC**. n. 8, p. 42-44, 2006.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. 4ªed. New Jersey. 1999. 663p.

6. ANEXOS

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:
Artigos em português – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
Artigos em inglês – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
Artigos em espanhol – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

Título ▲

Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
* Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
* Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
* Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
* Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
* As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores ▲

Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
* O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

* São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
* Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
* Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo ▲

* O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
* Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
* Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.
* O objetivo deve estar separado da descrição de material e métodos.
* Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
* O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação ▲

* A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
* Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
* Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
* Não devem conter palavras que componham o título.
* Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução ▲

* A palavra Introdução deve ser centralizada na página e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
* Deve ocupar, no máximo, duas páginas.
* Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
* O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos ▲

* A expressão Material e Métodos deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
* Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
* Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
* Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

* Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
* Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
* Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
* Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
* Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.
* Pode conter tabelas e figuras.

Resultados e Discussão ▲

* A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Resultados e Discussão devem ser grafados com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
* Deve ocupar quatro páginas, no máximo.
* Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
* As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
* Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.
* Dados não apresentados não podem ser discutidos.
* Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
* As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
* Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
* As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões ▲

* O termo Conclusões deve ser centralizado na página e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
* Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.
* Não podem consistir no resumo dos resultados.
* Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
* Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos ▲

* A palavra Agradecimentos deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
* Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
* Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências ▲

* A palavra Referências deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
* Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos

últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
* Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.
* Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
* Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
* Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
* Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
* Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
* Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)
AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.
Artigos de periódicos
SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.
Capítulos de livros
AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.
Livros
OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).
Teses e dissertações
HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucurui), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
Fontes eletrônicas
EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: 'http://www.cpao.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004. Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

* Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.
* A autocitação deve ser evitada.

Redação das citações dentro de parênteses
* Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de

vírgula e ano de publicação.
* Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
* Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
* Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
* Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
* Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
* Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses
* Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas ▲

* Fórmulas, expressões, símbolos ou equações matemáticas, escritas no editor de equações do programa Word, devem ser enviadas também em arquivos separados, no programa Corel Draw, gravadas com extensão CDR.
* No texto, devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
* Não devem apresentar letras em itálico ou negrito.

Tabelas ▲

* As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após referências.
* Devem ser auto-explicativas.
* Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
* Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
* O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
* No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
* Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
* Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
* Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
* Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

* Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares.
* Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
* As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

* Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
* Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
* Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ^{ns} (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

* São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
* Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
* O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
* Devem ser auto-explicativas.
* A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
* Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
* Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
* O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
* As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
* Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

* Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
* As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
* Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
* Devem ser gravadas no programa Word, Excel ou Corel Draw (extensão CDR), para possibilitar a edição em possíveis correções.
* Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
* No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
* Não usar negrito nas figuras.
* As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
* Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.