

Uso do metabissulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Lílian Maria Nery de Barros Góes*, Paulo de Paula Mendes, Emiko Shinozaki Mendes, Cristiane Maria de Freitas Ribeiro e Roseli Pimentel Pinheiro e Silva

Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: nerygoes@yahoo.com.br

RESUMO. O camarão cultivado destaca-se como um dos principais itens responsáveis pelo superávit da balança comercial do pescado brasileiro. Seu escoamento tem sido realizado para a América do Norte e Europa, onde as exigências de qualidade, especialmente quanto à carga microbiana no camarão, são extremamente altas. Dadas as exigências dos importadores, objetivou-se avaliar a eficácia do conservante metabissulfito de sódio como agente antimicrobiano na carcinicultura. Camarões *Litopenaeus vannamei* de classificação 81/100 foram submetidos a 10 concentrações do metabissulfito de sódio (de 1% a 10%), durante 10 e 20 minutos. Foram realizadas contagens de bactérias aeróbias mesófilas, sendo as colônias isoladas submetidas ao teste bacterioscópico pelo método de Gram e a provas bioquímicas. Foram isoladas sete espécies de vibrio e observou-se que o número de unidades formadoras de colônias decresceu em função do uso de metabissulfito, ficando demonstrada a sua ação inibitória sobre as bactérias mesófilas aeróbias em todas as concentrações utilizadas.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, metabissulfito de sódio, bactérias mesófilas.

ABSTRACT. Use of sodium metabisulfite to control microorganism's population in shrimps *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). The cultivated shrimp comes if highlighting as one of the main responsible items for the superavit of the Brazilian's fish trade balance. Its drainage has been accomplished for North America and Europe, where the quality demands is extremely high, especially for microbial load existent at shrimp. Given the demands of importers, the aim was to evaluate the effectiveness of conservator sodium metabisulfite as an antimicrobial agent in the shrimp culture. Shrimps *Litopenaeus vannamei* classified as 81/100 (10 to 12 g) were submitted to 10 concentrations of sodium metabisulfite (from 1 to 10%), during 10 and 20 minutes. The aerobic mesophilic bacteria were counted and the isolated colonies were submitted to a bacterioscopic test using the Gram method and biochemical tests. It was observed that the number of colony-former units decreased due to metabisulfite use, thus demonstrating its inhibitory effect on the aerobic mesophilic bacteria at the concentrations used.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, sodium metabisulfite, mesophilic bacteria.

Introdução

O camarão marinho cultivado vem se destacando, nos últimos anos, como um dos principais responsáveis pelo superávit da balança comercial do pescado brasileiro. De acordo com Rocha (2004), o valor alcançado com as exportações desse agronegócio, no período de janeiro a novembro de 2003 foi de US\$ 210,47 milhões e, portanto, mais da metade de toda a exportação do setor de pescado do Brasil. Apesar da atividade de carcinicultura ter sido altamente crescente, a partir de 1996, a produção de 2004 foi de apenas 75.904 t, o que representou uma queda de 15,8% em relação a 2003 (Rodrigues, 2005). Este declínio foi associado

ao processo *antidumping* estabelecido pelos americanos, a desvalorização do dólar e, principalmente, ao surgimento de doenças.

O escoamento do camarão cultivado do Brasil, em 2004, foi realizado principalmente para a América do Norte (23,09%) e a Europa (75,61%). Entre os países da comunidade européia destacam-se a França, Espanha, Itália, Alemanha, Portugal e a Bélgica, pelo volume de compra e rigidez no tocante as exigências da qualidade, em especial da carga microbiana existente no camarão. Silva *et al.* (2003) alertaram sobre a obrigatoriedade de se produzir camarões congelados isentos de contaminação microbiológica, com vistas a evitar prejuízos ao

consumidor. Enfatizaram também que, do ponto de vista econômico, contaminações microbiológicas podem comprometer seriamente a imagem do produto brasileiro, prejudicando as futuras exportações.

Dada a importância do camarão para a economia do Brasil e as exigências cada vez mais acentuadas dos países importadores, quanto à qualidade do produto final, faz-se necessário o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de processamento pós-colheita dos camarões cultivados. Na carcinicultura, é comum o uso do metabissulfito de sódio com a finalidade de evitar o aparecimento de pontos pretos, conhecido também como “black spot” ou melanose. Segundo Silva (1988), o metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) é o conservante de maior estabilidade e que apresenta a maior quantidade de dióxido de enxofre (SO_2), quando diluído em água. Segundo Laurila et al. (1998), os sulfitos são agentes multifuncionais e possuem capacidade controladora do desenvolvimento microbiológico nos alimentos.

O resíduo do metabissulfito de sódio é o dióxido de enxofre (SO_2), que não é prejudicial à saúde dos consumidores, quando se encontra numa faixa de 40 ppm a 100 ppm, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), citado por Rocha e Maia (1998), tendo, por isso, exigências diferenciadas dos países importadores quanto à sua concentração em camarões frescos e congelados. Silva (1988) alertou que o procedimento preconizado pelo FDA é a rejeição de todo lote mesmo que apenas uma das amostras analisadas apresente valores superiores a 100 ppm, porque poderá ocasionar crises de asma, reações cutâneas (urticárias), diarreias, choque anafilático, dores de cabeça, dores abdominais, náuseas e tonturas em indivíduos sensíveis.

Devido à sua ação antioxidante, o metabissulfito de sódio seqüestra o oxigênio (O_2) tanto da água quanto do alimento, gerando assim um ambiente anaeróbico, o que conseqüentemente interfere sobre os microrganismos aeróbios presentes. Todavia, os aeróbios que têm capacidade de serem anaeróbios facultativos e os anaeróbios são favorecidos com esta redução do oxigênio. Por isso, é necessário saber qual é a microbiota naturalmente presente no ambiente em que o referido alimento está envolvido. No caso das carciniculturas, as bactérias do gênero *Vibrio* predominam no ambiente de cultivo, de acordo com Perazzolo (1994).

Segundo Twedt et al. (1984), os víbrios são bastonetes Gram negativos, curvos ou retos e halofílicos, bastante sensíveis às baixas temperaturas e, portanto, em produto congelado é pequena a probabilidade de sua presença. Rivera e Martins

(1996) afirmaram que pelo menos 11 espécies de víbrio são reconhecidamente patogênicas ou potencialmente patogênicas para humanos. Estes autores ressaltaram que gastroenterites devido ao *Vibrio parahaemolyticus* são quase que exclusivamente associadas ao consumo de alimentos de origem marinha. Contudo, a contaminação de camarões por bactérias, especialmente por víbrios, pode ocasionar danos à saúde dos consumidores, além de prejuízos econômicos. Desta forma, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana do metabissulfito de sódio quando utilizados em camarões marinhos cultivados da espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

Material e métodos

Análises microbiológicas de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*, submetidos às diferentes concentrações do metabissulfito de sódio, foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Carne e Leite do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Estado de Pernambuco, no primeiro semestre de 2005. Os camarões foram oriundos de uma carcinicultura comercial, localizada no município de Goiana, Estado de Pernambuco. Apresentavam peso médio de 10 g a 12 g, equivalente à classificação 81/100 (indivíduos por quilo). Após sua captura, realizada com rede “bag-net”, foram abatidos com choque térmico (água doce + gelo), em conformidade com os métodos tradicionalmente utilizados na fazenda e posteriormente imersos em água com o conservante metabissulfito de sódio.

Foram avaliadas 10 concentrações de metabissulfito de sódio (1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% e 10%). As soluções foram preparadas em recipientes plásticos, com capacidade de 40 L. O conservante foi previamente diluído em água doce e imediatamente utilizado, objetivando minimizar as perdas dos sulfatos por volatilização. O tempo de exposição dos camarões ao metabissulfito foi de 10 minutos e de 20 minutos. A atividade antimicrobiana do metabissulfito de sódio (MS) foi avaliada em amostras de camarões abatidos em solução de água e gelo e depois submetidos ao conservante (água + MS).

Para cada concentração de metabissulfito de sódio e tempo de imersão, utilizaram-se amostras com aproximadamente 50 g de camarões. Os camarões foram acondicionados em redes de náilon e imersos nas soluções. Decorrido o tempo de exposição às soluções, as amostras foram acondicionadas em placas de Petri esterilizadas, envolvidas em sacos plásticos, próprios para alimentos, e acondicionadas em caixas térmicas sem

gelo, pois segundo Silva *et al.* (1997), os vibrios são sensíveis ao frio. Posteriormente, foram encaminhadas para o laboratório onde se procederam as análises.

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com o método descrito no FDA (1998) para contagem de bactérias aeróbias mesófilas. Para a referida análise, foram diluídas 25 g da amostra em 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA), obtendo-se a diluição de 10^{-1} . Alíquotas de 0,1 mL da diluição foram distribuídas em placas de Petri estéreis em duplicatas, contendo Ágar MacConkey suplementado com 1% de cloreto de sódio (NaCl) para favorecer as bactérias halofílicas Gram negativas, microbiota normalmente encontrada em ambientes marinhos, de acordo com James (2005). Após estes procedimentos, as placas foram invertidas e incubadas a 35-37°C, durante 48 horas. As contagens foram realizadas com 24 horas e 48 horas, sendo as colônias morfológicamente diferentes repicadas novamente para o mesmo meio de cultivo e incubadas a 35-37°C por 24 horas, para seu isolamento e melhor visualização.

As colônias isoladas foram submetidas ao teste bacterioscópico pelo método de Gram e aquelas que apresentavam características de bastonetes retos ou curvos e Gram-negativos foram estocadas em Tríplice Soy Ágar (TSA) com 1,0% de cloreto de sódio (NaCl) para posterior identificação bioquímica (crescimento a 0%, 1%, 3%, 6%, 8% e 10% de NaCl, oxidase, VP, arginina dihidrolase, lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, urease, gelatinase, produção de ácido a partir de sacarose, celobiose, lactose, arabinose, manose e manitol), conforme a orientação de Holt *et al.* (1994) e do FDA (1998).

Para avaliar o número de bactérias (UFC/g) presentes nos camarões em função da concentração de metabissulfito de sódio na solução de imersão e do tempo de exposição dos camarões ao conservante, utilizou-se o seguinte modelo linear múltiplo:

$$UFC_i^\lambda = \beta_0 + \beta_1(\text{Conc}_{MS})_i + \beta_2 \text{TExp}_i + \varepsilon_i \quad (1)$$

Em que: UFC – unidades formadoras de colônias; λ – fator de transformação de Box e Cox; β_0 , β_1 e β_2 – parâmetros do modelo; Conc_{MS} – concentração do metabissulfito de sódio; TExp – tempo de exposição; ε_i – erro associado a i -ésima observação.

Para selecionar as variáveis dependentes significativas nos modelos, utilizou-se o processo de *Stepwise* (Forward), estabelecendo-se como padrão a estatística “F” de Snedecor de entrada e saída em 4.

Associado ao processo de *Stepwise*, utilizou-se o processo de Box e Cox (Box e Cox, 1964) à variável resposta, objetivando minimizar a soma dos quadrados dos resíduos, conseqüentemente a variância experimental. Para verificar se as pressuposições de normalidade não foram violadas em decorrência das transformações, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, de acordo com Zar (1999). Para estimar os parâmetros do modelo e o uso do teste de normalidade, utilizou-se o programa computacional SysEapro (v.1). Foi utilizado também o programa Excel para obtenção de gráficos.

Resultados e discussão

Ao correlacionar a carga microbiana dos camarões, quando submetidos às diversas concentrações de metabissulfito de sódio e aos tempos de exposição (10 min e 20 min), pode-se modelar essas variáveis e maximizar o índice determinístico (R^2), utilizando transformador raiz quadrada. Desta forma, os parâmetros do modelo foram estimados utilizando-se a seguinte equação:

$$UFC = [2,1807(\text{Conc}_{MS}) + 2,0723\text{TExp}] \quad R^2 = 93,90\% \quad (2)$$

De acordo com a estatística (R^2), verificou-se que os pontos observados foram bem representados pelo modelo proposto. Ao analisar os resíduos studentizados, não foram observados tendências ou pontos discrepantes, assegurando a robustez do referido modelo. As pressuposições de normalidade do vetor resposta não foram violadas.

Foram identificados bioquimicamente *Vibrio alginolyticus*, *V. furnissi*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela* e *V. vulnificus*. Ressalta-se que na legislação estavam estabelecidos, para pescados crus refrigerados ou congelados, os limites máximos de 10^2 , 10^3 e 5×10^3 UFC/g para coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*, respectivamente (Silva *et al.*, 1997). Em 2001, com a reformulação da legislação, apenas os estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp. foram mencionados, sendo os vibrios excluídos, apesar de serem os principais microrganismos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares com pescado (Anvisa, 2001).

Observou-se um decréscimo do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em função do aumento da concentração de metabissulfito. Essa tendência corrobora com os relatos de Taylor *et al.* (1986), ao afirmarem que o metabissulfito de sódio é um bom agente antimicrobiano. Verificou-se que essa ação redutora do metabissulfito de sódio foi

semelhante nos dois períodos de imersão pesquisados (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Unidades formadoras de colônias (UFC) em relação às concentrações de metabissulfito de sódio (MS) e os tempos de exposição dos camarões na solução de imersão.

MS (%)	Tempo de exp.	UFC/g	Tempo de exp.	UFC/g
1	10 minutos	$1,8 \times 10^3$	20 minutos	$2,4 \times 10^3$
2	10 minutos	$1,0 \times 10^3$	20 minutos	$2,7 \times 10^3$
3	10 minutos	$1,3 \times 10^3$	20 minutos	$1,2 \times 10^3$
4	10 minutos	$2,6 \times 10^3$	20 minutos	$3,9 \times 10^3$
5	10 minutos	$1,1 \times 10^3$	20 minutos	$2,3 \times 10^3$
6	10 minutos	$1,5 \times 10^3$	20 minutos	$2,2 \times 10^3$
7	10 minutos	$8,7 \times 10^2$	20 minutos	$2,9 \times 10^3$
8	10 minutos	$2,7 \times 10^3$	20 minutos	$2,8 \times 10^3$
9	10 minutos	$2,6 \times 10^3$	20 minutos	$2,2 \times 10^3$
10	10 minutos	$2,8 \times 10^3$	20 minutos	$1,8 \times 10^3$

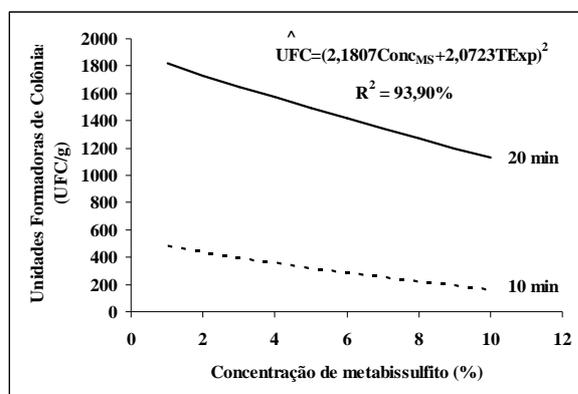


Figura 1. Unidades formadoras de colônias em relação às concentrações de metabissulfito e os tempos de exposição nos camarões ao conservante.

Este fato deve-se à condição de anaerobiose proporcionada pelo seqüestro do oxigênio pelo metabissulfito de sódio. A perda do oxigênio beneficia populações de microrganismos anaeróbios e/ou anaeróbios facultativos, que se encontravam inibidos pela aerobiose ou pela predominância de outros microrganismos aeróbicos. A exemplo do citado, Laurila et al. (1998) alertaram quanto à geração de condições anaeróbias ideais para o desenvolvimento de fermentação anaeróbica e organismos patogênicos em linhas de processamentos de alimentos, onde ocorre adição de sulfitos concomitantes à embalagem a vácuo, ou seja, há potencialização das condições de anaerobiose, neste processamento, quando se utiliza o referido conservante.

Vieira (2004) relatou a necessidade de se atentar para as bactérias do gênero *Clostridium* no processamento de pescado destinado à comercialização sob condição de anaerobiose (enlatamento e embalagem a vácuo), por se tratarem de microrganismos anaeróbios restritos, comumente

encontrados em meios aquáticos, em especial a cepa tipo E do *Clostridium botulinum*. Todavia, segundo a mesma autora, procedimentos normais de cocção são suficientes para inativar qualquer toxina que por ventura tenha sido formada, não havendo risco à saúde dos consumidores em se tratando de pescado fresco ou congelado, como é o caso do camarão marinho.

Hatha et al. (2003) avaliaram microbiologicamente camarões *Penaeus monodon*, sob diversas formas de apresentação, sem a adição de metabissulfito de sódio, sendo 846 amostras de camarões “in natura” descascado sem veia e com cauda (RPTO), 928 amostras de camarões cozido descascado sem veia e com cauda (CPTO), 295 amostras de camarões descabeçado com veia e com casca (HLSO), 141 amostras de camarões in natura descabeçado, descascado e sem veia. Obtiveram resultados para contagem total de germes (PCA) em todas as amostras de camarões cozidos dentro dos limites aceitáveis ($1,0 \times 10^6$ UFC/g), porém as demais formas de apresentações excederam o limite máximo. Resultados semelhantes foram relatados por Silva et al. (2003), que avaliaram a qualidade microbiológica dos camarões tipo exportação congelados do Estado do Ceará, encontrando contaminação por coliformes totais e fecais e contagem padrão de bactérias acima dos limites máximos estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Estes resultados reforçam a necessidade de melhorias no cultivo e manipulação deste alimento (boas práticas de manejo e de fabricação), além de requerer a utilização de substâncias capazes de estacionar ou eliminar o desenvolvimento microbiano em camarões.

Mendes et al. (2003), ao testarem diversas concentrações de metabissulfito de sódio em algumas bactérias de origem marinha, verificaram a sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* Albany, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harvey*, *V. cholerae* não O1, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* ao conservante. Estes mesmo autores relataram que os demais microrganismos *Salmonella enterica* Infantil, *Citrobacter freundii*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (EPEC 025, EPEC 019 e EIEC), patogênicos para humanos, foram resistentes ao conservante. Ao analisar cogumelos em conserva, Bragagnolo et al. (2001) observaram que baixos níveis de dióxido de enxofre são suficientes para exercer função antimicrobiana. Da mesma forma, Dipersio et al. (2003) citaram a eficiência do metabissulfito de sódio na inativação de bactérias do gênero *Salmonella* durante o processo de secagem e armazenamento de fatias de maçãs.

A ação antimicrobiana do metabissulfito de sódio em camarões do gênero *Penaeus*, quando expostos as concentrações de 0,6%, 1,25% e 2,5% por cinco minutos já foi pesquisada também por Pyle e Koburger (1981). Ao analisarem o percentual de redução dos microrganismos nos camarões com metabissulfito, em comparação com camarões não submetidos ao tratamento com o conservante, detectaram taxas com 49%, 66% e 74% de redução, respectivamente, confirmando, desta forma, a eficiência do metabissulfito como agente antimicrobiano.

Conclusão

Ao avaliar a ação antimicrobiana do metabissulfito de sódio na pós-colheita do camarão *Litopenaeus vannamei* concluiu-se que esse conservante foi eficiente em todas as concentrações estudadas devido à sua ação antioxidante.

Referências

- ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. *J. Royal Stat. Soc., Ser. B*, v. 26, p. 211-243, 1964.
- BRAGAGNOLO, N. *et al.* Avaliação dos teores de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva. *Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 103-107, 2001.
- DIPERSIO, P.A. *et al.* Inactivation of *Salmonella* during drying and storage of apple slices treated with acidic or sodium metabisulfite solutions. *J. Food Protect.*, Des Moines, v. 66, n. 12, p. 2245-2251, 2003.
- FDA, *Food and drug administration*. Bacteriological analytical manual 8. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998.
- HATHA, A.A.M. *et al.* Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquacultures shrimp. *J. Food Microbiol.*, London, v. 82, p. 213-221, 2003.
- HOLT, J.G. *Figura Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Maryland: Henslyl, 1994.
- JAMES, M.J. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 119-128, 2005.
- LAURILA, E. *et al.* The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Agbiotech News Inf.*, Oxon, v. 9, n. 4, p. 53-66, 1998.
- MENDES, E.S. *et al.* Efeito do metabissulfito de sódio em algumas bactérias de origem marinha. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA - CONBEP*, 13., 2003, Porto Seguro. *Anais...* Porto Seguro: [s.n.], 2003.
- PERAZZOLO, L.M. *Estudo do sistema imune do camarão marinho Penaeus paulensis, com ênfase no sistema pró-fenoloxidase*. 1994. Dissertação. (Mestrado)-Centro de Ciências Agrárias, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 1994.
- PYLE, M.L.; KOBURGER, J.A. The effect of water, bisulfite and hypochlorite rinses on the microbial flora of shrimp. *In: ANNUAL TROPICAL AND SUBTROPICAL FISHERIES TECHNOLOGICAL CONFERENCE OF THE AMERICAS*, 6., 1981, Santo Antonio. *Proceedings...* Santo Antonio: [s.n.], 1981. p. 70-74.
- RIVERA, I.N.G.; MARTINS, M.T. Bactérias patogênicas no ambiente aquático. *Rev. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 17, p. 115-136, 1996.
- ROCHA, I.P. ABCC Aponta crescimento da carcinicultura nacional. *Rev. Nac. Carne*, São Paulo, n. 323, 2004.
- ROCHA, I.P.; MAIA, E.P. Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira. *In: AQUACULTURA BRASIL*, 1998, Recife. *Anais...* Recife: [s.n.], v. 1, 1998. p. 213-235.
- RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha. Desempenho 2004. *Rev. Assoc. Bras. Criad. Camarão*, Recife, n. 2, p. 38-44. 2005.
- SILVA, R.R. da. Considerações sobre o uso e o mal uso de sais de sulfite em crustáceos. *In: SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO*, 1988, Santos. *Anais...* Santos: Loyola, 1988. p. 244-259.
- SILVA, A.I.M. *et al.* Qualidade microbiológica de camarão tipo exportação, processado - congelado em estabelecimento no estado do Ceará. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA-CONBEP*, 13., 2003, Porto Seguro. *Anais...* Porto Seguro: [s.n.], 2003.
- SILVA, N. *et al.* *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1997.
- TAYLOR, S.L. *et al.* *Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity*. New Jersey: Academic Press, 1986.
- TWEDT, R.M. *et al.* *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, Washington, D.C.: American Public Health Association, 1984. p. 368.
- VIEIRA, R.H.S.F. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado. teoria e prática*. São Paulo: Varela. 2004.
- ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 4. ed [s.l.]: Prentice Hall, 1999.

Received on January 31, 2006.

Accepted on June 20, 2006.