

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS- UFAL
FACULDADE DE NUTRIÇÃO-FANUT
MESTRADO EM NUTRIÇÃO

**SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA E BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
HISTAMINA EM CAVALA (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829) E
DOURADO (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) COMERCIALIZADOS EM
MACEIÓ-AL.**

JAMMILY DE OLIVEIRA VIEIRA MOREIRA

MACEIÓ
2018

JAMMILY DE OLIVEIRA VIEIRA MOREIRA

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA E BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA EM CAVALA (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829) E DOURADO (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) COMERCIALIZADOS EM MACEIÓ-AL.

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito final à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador (a): **Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento**

Co-Orientador(a): **Prof^a. Dr^a Maria Cristina Delgado da Silva**

MACEIÓ – 2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

M838s Moreira, Jammily de Oliveira Vieira.
Segurança microbiológica e bactérias produtoras de histamina em cavala (*Scomberomorus cavalla Cuvier*, 1829) e dourado (*Salminus brasiliensis Cuvier*, 1816) comercializados em Maceió / Jammily de Oliveira Vieira Moreira. - Maceió, 2018.

76 f. : il. color.

Orientador: Ticiano Gomes do Nascimento.

Co-orientadora: Maria Cristina Delgado da Silva.

Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2018.

Bibliografia: F. 58-76.

1. Peixes – Alimentação e ração. 2. Peixes – Doenças. 3. Análise microbiológica. 4. Histamina. 5. Enterobacteriaceae. 6. Cavala (Peixe). 7. Dourado (Peixe). I. Título.

CDU: 612.392.8:579.67

**MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**



Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160

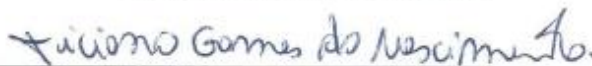
**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO**

**“PERFIL DE MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS E
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA EM CAVALA
(SCOMBEROMORUS CAVALLA CUVIER, 1829) E DOURADO
(SALMINUS BRASILIENSIS CUVIER, 1816) DA COSTA
MARÍTIMA DE MACEIÓ – AL”**

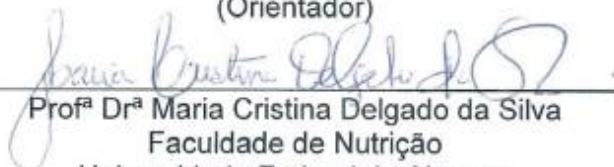
por

JAMMILY DE OLIVEIRA VIEIRA MOREIRA

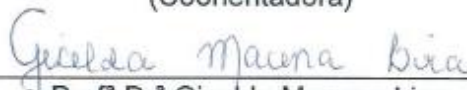
A Banca Examinadora, reunida aos 26/10/2018, considera a
candidata **APROVADA**.



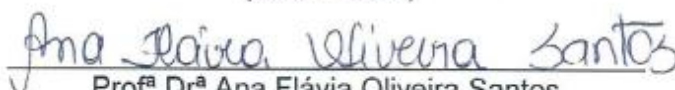
Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)



Profª Drª Maria Cristina Delgado da Silva
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Coorientadora)



Profª Drª Giselda Macena Lira
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)



Profª Drª Ana Flávia Oliveira Santos
Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Examinadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao amor da minha vida, aquele que abdicou de tanta coisa para viver esse sonho comigo.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus por seu infinito amor, cuidado e tanta paciência comigo. Agradeço ao meu amigo Genildo pela ideia de fazer esse mestrado e imensa ajuda na seleção, aos meus pais por me dizerem que eu era capaz, quando muitas vezes pensei em desistir, agradeço ao meu esposo, Leonardo, amigo de todas as horas e meu porto seguro, quero agradecer a minha filhinha Liesel, que com apenas dois meses de vida já fazia companhia à mamãe no laboratório.

Agradeço ao meu orientador, Professor Ticiano Gomes, exemplo de cientista, professor e orientador, obrigada pela bondade, paciência e compreensão, pois foram muitos percalços... A minha co-orientadora, Maria Cristina Delgado, exemplo de mulher, uma pessoa com o coração do tamanho do mundo, me espelhei muito na senhora para não desistir!

Agradeço aqueles que me ajudaram a por a “mão na massa”, os colegas de laboratório, Rafa, Lene, Rodrigo, Elisabeth e ao técnico Cantídio.

Agradeço à Universidade Federal de Alagoas, instituição que amo e admiro.

Por último, mas não menos importante, à FAPEAL pelo incentivo financeiro da bolsa de pesquisa.

RESUMO

Peixes e mariscos são importantes fontes de proteína animal na maior parte do mundo. Do ponto de vista nutricional, são ricos em vitaminas e minerais, além de apresentar ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3. Entretanto, por se tratar de um alimento altamente perecível o pescado e seus derivados podem ser veículos de enfermidades transmitidas por alimentos causadas por parasitas, toxinas, vírus ou bactérias patogênicas e também por perigos químicos, particularmente a histamina. Trata-se de uma amina biogênica produzida por ação de bactérias que causam a degradação de aminoácidos presentes naturalmente em determinados tipos de pescados. A histamina é termoestável e, se produzida na matéria-prima, não será eliminada no envasamento ou na defumação a quente. O objetivo desse estudo foi avaliar a segurança microbiológica de acordo com a legislação vigente e a possível presença de bactérias produtoras de histamina em peixes. Foram coletadas 40 amostras de peixes *in natura*, sendo 20 de dourado e 20 de cavala adquiridas aleatoriamente em locais de comercialização no município de Maceió – AL, para a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positivo e de enterobactérias, pesquisa de *Salmonella* sp e determinação de bactérias produtoras de histamina. Empregou-se metodologia preconizada por APHA, para avaliação microbiológica e o meio Niven com o Sistema BacTray para identificação das bactérias produtoras de histamina. Diante dos resultados obtidos, constatou-se que as 40 (100%) amostras apresentaram-se próprias para consumo, segundo a legislação vigente, com ausência de *Salmonella* sp e contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, < 10 UFC/g. A contagem de enterobactérias variou entre < 10 e 1×10^5 UFC/g. Quanto a prevalência das bactérias produtoras de histamina foram identificadas as seguintes espécies: 27% de *Morganella morganii*, 15,4% *Citrobacter diversus (koseri)*, 11,5% *Proteus vulgaris*, 11,5% *Klebsiella oxytoca*, 11,5% *Enterobacter asburiae*, 3,8% *Citrobacter freudii*, 3,8% *Enterobacter cloacae*, 3,8% *Klebsiella ozonae*, 3,8% *Escherichia coli*, 3,8% *Citrobacter amaloniticus* e 3,8% *Enterobacter sakazakii*. A presença dessas bactérias nos alimentos é um bom indicador de contaminação por manipulação e deterioração, dessa forma, conclui-se que a qualidade e segurança desse pescado encontra-se comprometidas, pois a possível presença de histamina produzida por esses microorganismos acarretará risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Peixes, avaliação microbiológica, bactérias produtoras de histamina, *Enterobacteriaceae*.

ABSTRACT

Fish and shellfish are important sources of animal protein in most parts of the world. From the nutritional point of view, they are rich in vitamins and minerals, besides presenting polyunsaturated fatty acids of the series omega-3. However, because it is a highly perishable food fish and its derivatives can be vehicles of foodborne diseases caused by parasites, toxins, viruses or pathogenic bacteria and also by chemical hazards, particularly histamine. It is a biogenic amine produced by bacteria that cause degradation of naturally occurring amino acids in certain types of fish. Histamine is thermostable and, if produced in the raw material, will not be eliminated in potting or hot smoking. The objective of this study was to evaluate the microbiological safety according to the current legislation and the possible presence of histamine-producing bacteria in fish. A total of 40 samples of fresh fish were collected, 20 of golden and 20 of mackerel were collected at commercial locations in the municipality of Maceió - AL, for the quantification of Staphylococcus coagulase positive and enterobacteria, Salmonella sp and determination of producing bacteria of histamine. A methodology recommended by APHA for microbiological evaluation and the Niven medium with the BacTray System for the identification of the histamine-producing bacteria were used. According to the current legislation, 40 (100%) samples were present for consumption, with absence of Salmonella sp and counts of Staphylococcus coagulase positive <10 CFU / g. The enterobacteria count ranged from <10 to 1x10⁵ CFU / g. As for the prevalence of histamine-producing bacteria, the following species were identified: 27% Morganella morganii, 15.4% Citrobacter diversus (koseri), 11.5% Proteus vulgaris, 11.5% Klebsiella oxytoca, 11.5% Enterobacter asburiae, 3.8% Citrobacter freundii, 3.8% Enterobacter cloacae, 3.8% Klebsiella ozonae, 3.8% Escherichia coli, 3.8% Citrobacter amaloniticus and 3.8% Enterobacter sakazakii. The presence of these bacteria in food is a good indicator of contamination due to manipulation and deterioration, so it is concluded that the quality and safety of this fish is compromised, since the possible presence of histamine produced by these microorganisms will be a risk to the health of the fish consumer.

Key words: Fish, microbiological evaluation, histamine-producing bacteria, Enterobacteriaceae.

LISTA DE FIGURAS

Da revisão

Figura 1. Estrutura química da histamina.....	20
Figura 2. Mecanismo do processo de intoxicação por histamina	21
Figura 3. Formação de histamina nos alimentos.....	24

Do artigo de resultados

Figura 1. Sequência de identificação das bactérias histamina positiva: (A) e (B) Placa de meio Niven com colônias características (presuntivo), (C) e (D) teste confirmativo, com produção de gás e coloração roxa do meio, (E) kit de testes bioquímicos para identificação. Sequência para identificação das bactérias histamina positiva.....	41
--	----

LISTA DE TABELAS

Do artigo de resultados

- Tabela 1. Resultados das análises microbiológicas para peixes *in natura* com base no padrão microbiológico estabelecido pela legislação vigente.....42
- Tabela 2. Distribuição do número de amostras de peixes “in natura” segundo a contagem de enterobactérias nos meios Agar VRBG e Agar niven44
- Tabela 3. Distribuição do número de amostras de peixes constatada presença de bactérias produtoras de histamina e identificação das espécie45
- Tabela 4. Comportamento das cepas identificadas como bactérias produtoras de histamina, isoladas de amostras de peixes comercializados em Maceió – Al, com relação aos testes bioquímicos.....46
- Tabela 5. Espécies de bactérias produtoras de histamina isoladas de amostras de peixes “in natura” comercializados em Maceió47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Peixes.....	18
3.2 Histamina.....	20
3.3 Enterobactérias.....	25
3.4 Legislação.....	30
ARTIGO DE RESULTADOS	33
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
4. CONCLUSÃO.....	49
5. REFERÊNCIAS DO ARTIGO.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	58

Peixes e mariscos são importante fonte de proteína animal na maior parte do mundo. Do ponto de vista nutricional, são ricos em vitaminas D, A e B, e minerais como, cálcio, iodo, zinco ferro e selênio, além de, apresentar ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 (FAO, 2016; ARAÚJO et al., 2014). O consumo de peixes vem sendo bastante estimulada pela divulgação de estudos recentes devido a sua ingestão está associado a uma melhor qualidade de vida (SARTORI et al., 2012, BRASIL, 2014).

Em 2014, o total mundial da produção de pesca de captura foi de 93,4 milhões de toneladas, das quais, 81,5 milhões de toneladas procedentes de águas marinhas e 11,9 milhões de toneladas de águas continentais (FAO, 2016). No Brasil, a produção no mesmo ano correspondeu a 235.527 toneladas e considera-se um aumento significativo de 104% na pesca e aquicultura até 2025, devido ao aumento no consumo e investimentos no setor (FAO, 2016).

Na costa marítima do Estado de Alagoas, onde foi conduzido o presente estudo, a pesca é uma importante atividade econômica, pois dela depende a sobrevivência de muitos pescadores e os pratos à base de peixe e marisco não somente fazem parte da dieta da população litorânea como também são muito apreciados pelos turistas (MENEZES et al., 2009).

O consumo de alimentos contaminados é uma das principais causas de doenças de origem alimentar. A Organização Mundial da Saúde considera que mais de 60% dessas doenças são atribuídas a agentes etiológicos como bactérias, vírus, fungos e parasitas, principalmente devido à aplicação de práticas higiênico-sanitárias inadequadas (SILVA JUNIOR, 2002).

Diversos pesquisadores têm avaliado a qualidade microbiológica de pescados comercializados em várias regiões no Brasil (MUJICA; LIMA; CARNEIRO, 2014), por se tratar de um alimento altamente perecível, pela sua composição química, pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água e pela alta atividade metabólica da microbiota normal (TAVARES, 2012). A avaliação microbiológica toma por base parâmetros e limites recomendados pela RDC N°12, (2001) na qual define os microrganismos a serem pesquisados e o número máximo de patógenos permitidos nos alimentos.

Um alimento é considerado seguro para consumo quando lhe são aplicadas medidas sanitárias, de forma efetiva e eficaz durante a sua produção e em todos os elos da cadeia produtiva. Tais cuidados visam fornecer um

alimento inócuo, isto é, livre de perigos e das condições que possam representar risco à saúde do consumidor. Os perigos em alimentos podem ser de natureza física, química ou biológica. Dentre os perigos químicos em alimentos, destaca-se uma substância química denominada de histamina. Trata-se de uma amina biogênica produzida por bactérias que degradam aminoácidos histidina presentes naturalmente no alimento, essa atividade é possível devido a falhas na temperatura de conservação do alimento, que deve sempre ser mantido abaixo de 4^oC a 5^oC.

Teores elevados dessas substâncias podem causar intoxicação alimentar, por ser a amina mais tóxica e a que está mais ligada aos casos de surtos. Entretanto, o conteúdo de histamina em pescado recém-capturado é baixo e seu aumento está relacionado à contaminação dos peixes após a captura, processo de deterioração, manipulação inadequada do produto em temperaturas altas de estocagem e condições precárias de higiene (VECIANA-NÓGUES et al., 1997).

Dentre os microrganismos produtores de histamina destaca-se a família *Enterobacteriaceae* que são as mais ativas na formação desse perigo químico e quando presentes no alimento indicam condições higiênicas sanitárias insatisfatórias. São bacilos Gram (-), os quais estão presentes no solo, água, vegetais e também na microbiota do trato gastrointestinal de animais e do homem. Estão associados a casos de pneumonia e infecções, além de diarreia e vômitos.

Diante do exposto o presente estudo propôs avaliar a qualidade microbiológica e investigar a presença de bactérias produtoras de histamina em amostras de peixes *in natura* comercializados em Maceió – AL.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Determinar a segurança microbiológica e perfil das bactérias produtoras de histamina em peixes cavala (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829) e dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816).

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo em amostras de peixes cavala e dourado comercializados em Maceió-AL, com base na Portaria 12/2001;
- Realizar a pesquisa de *Salmonella* sp em amostras de peixes cavala e dourado comercializados em Maceió-AL, com base na Portaria 12/2001;
- Comparar os resultados obtidos com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente, através da Portaria 12/2001;
- Investigar e quantificar a presença de bactérias produtoras de histamina em amostras de peixes cavala e dourado comercializados em Maceió-AL;
- Identificar através de provas bioquímicas cepas produtoras de histamina em amostras de peixes cavala e dourado comercializados em Maceió-AL.

3.1 PEIXES

Em relação ao aspecto nutricional, o peixe apresenta proteínas de alto valor biológico. Sabe-se, ainda, que constitui um alimento de origem animal, de fácil digestibilidade, com teor satisfatório em proteínas, gorduras insaturadas, vitaminas e minerais, podendo ser indicado para pessoas de qualquer idade, principalmente crianças, adolescentes e idosos, além de, pacientes convalescentes (LEDERER, 1991). O fato de estudos mostrarem que seu consumo é capaz de reduzir as Doenças Cardiovasculares (DCV) e outras Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), por serem fonte de Ácidos Graxos da série ômega 3, leva os médicos e nutricionistas a estimularem o consumo deste alimento (OLIVEIRA, 2013). Dessa forma, observa-se crescente procura por esse alimento, visto que, o mesmo pode fazer parte de diversos tipos de dietas, além de, apresentar benefícios à saúde (FAO, 2012).

Peixe fresco corresponde àquele conservado somente pelo resfriamento, a uma temperatura próxima à 0°C. Deve possuir pele firme, bem aderida, úmida e sem a presença de manchas. Os olhos devem ser brilhantes e salientes. As escamas devem apresentar-se unidas entre si, brilhantes e fortemente aderidas à pele. As brânquias devem apresentar cor que vai do rosa ao vermelho intenso, ser brilhantes e sem viscosidade. O odor deve ser característico e não repugnante (BRASIL, 2013). Deve também apresentar-se íntegro, com odor e sabor próprio, e aspecto geral sem alterações, mutilações, deformações e traumas, livre de parasitas, doenças microbianas e lesões (NUNES, 1994).

Por ser um alimento dos mais perecíveis devido à sua composição, necessita de cuidados adequados em sua manipulação, desde a captura até o consumo ou industrialização (SOUZA et al., 2016). Entre os aspectos fisiológicos e bioquímicos que propiciam condições intrínsecas favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, destaca-se sua elevada atividade de água, pH próximo da neutralidade, rápida ação de enzimas autolíticas, presença de gordura insaturada e rico em nutrientes facilmente utilizáveis pela microbiota natural ou contaminante.

O trinômio tempo x higiene x temperatura torna-se essencial para assegurar a conservação e qualidade do pescado. O tempo se refere à rapidez

com que se desencadeiam reações autolíticas e/ou bacterianas que, por outro lado, estão relacionadas com o grau de higiene do barco ou instalações frigoríficas e dos manipuladores do pescado. Somados às baixas temperaturas, se devidamente aplicadas, evitarão ou, pelo menos retardarão as reações de deterioração (VIEIRA, 2004).

O peixe dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) é um Characiforme de hábito diurno e carnívoro, de coloração típica amarelo-dourado (BRAGA et al., 2007), encontrado nas bacias do Pantanal e dos rios Paraná, Uruguai e São Francisco (FRACALOSSI, 2004). Essa espécie habita preferencialmente em ambientes lóticos, sendo caracterizado como um peixe bastante migrador (ZANIBONI-FILHO, 2000). Apresenta grande porte, com excelente qualidade organoléptica, elevado preço de mercado e, além disso, possui esportividade e agressividade, que o tornam excelente atrativo em estabelecimentos de pesque-pague (WEINGARTNER E ZABONI-FILHO, 2005).

Ramos Filho et al (2008) classificaram-o como peixe de baixo teor de gordura (entre 2 a 4%) e em relação à composição de ácidos graxos encontrados detectaram: ácidos palmítico (C 16:0) e oleico (C18:1 ω -9), seguidos em menor proporção pelo ácido esteárico (C18:0). É um peixe com elevado teor de proteína (21,12%), excelente sabor, sem espinhas, adequado para compor filé e bastante comercializado em Maceió, Alagoas, Brasil (MENDES FILHO et al., 2008).

Já a cavala (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829) é um peixe de corpo alongado, robusto e comprido lateralmente, apresenta coloração azul-metálica escurecida no dorso e o ventre prateado (FISHBASE, 2017). Alimenta-se basicamente de moluscos, crustáceos e de outros peixes (FIGUEIREDO; MENEZES, 2010) além de, apresentar ampla distribuição geográfica, por todo litoral brasileiro, principalmente nos Estados do PiauÍ, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas e Bahia (LESSA, 2006). É classificada como peixe gordo (entre 6 a 15 %), apresentando essa gordura dispersa por toda parte de seu corpo, principalmente na carne e nas peles.

Apresenta também elevados teores de proteínas, ácidos graxos saturados (esteárico), ácidos graxos monoinsaturados (oleico e palmitoleico) e ácidos graxos poli-insaturados como o EPA e o DHA e o da família n-6 (linoleico). Destaca-se na avaliação da qualidade nutricional dos lipídeos, os

índices de n-6/n-3, HH, IA e IT mostraram-se favoráveis quanto ao consumo alimentar (MENEZES et al., 2009).

Cabe acrescentar que esse peixe apresenta carne vermelha e sabor bastante acentuado, devido à presença de histidina em sua constituição. Esse aminoácido é facilmente convertido, por descarboxilação bacteriana, na amina biogênica histamina, o que pode conferir toxicidade ao alimento mesmo antes dele ser considerado organolepticamente inaceitável (LENZA, 2006). Além disso, essa espécie possui hábitos ativos como o atum e pode debater-se muito, antes de sua morte, quando capturados por redes ou anzóis, reduzindo o *rigor mortis* e prejudicando assim, a sua qualidade e o tempo de estocagem em gelo (VIEIRA, 2004).

3.2 HISTAMINA

A histamina é uma amina primária, 4(2-amino-etil)imidazol (figura 1) e se origina principalmente da descarboxilação do aminoácido L-histidina presente na forma livre, pela atividade da enzima histidina descarboxilase de bactérias naturalmente presentes nos alimentos. Trata-se de um perigo químico que pode estar presente no alimento e apresenta-se estável a elevadas temperaturas.

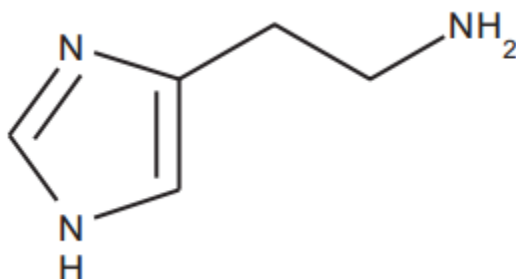


Figura 1- Estrutura química da histamina. Fonte: Huss. 1993

Essa amina é uma potente mediadora de numerosas reações fisiológicas, atuando como neurotransmissor no sistema nervoso central, e na função vasoativa, dilatando os pequenos vasos sanguíneos (CRIADO, 2010). Também está envolvida nos processos inflamatórios, na anafilaxia, nos processos alérgicos e em determinados tipos de reações à droga, além de, regular a secreção gástrica (OBRINK, 1991; MORRIS, 1992). Nos mamíferos, a

histamina é a principal e mais abundante amina biogênica, nos humanos ela é produzida e armazenada em grânulos em dois tipos de células do sistema imune, mastócitos e basófilos (TAVARES, 2012).

Em condições normais, a presença de histamina na dieta não tem consequências maléficas, entretanto, quando ingeridas em quantidades elevadas, ou quando a atividade das enzimas catabolizadoras for inibida, indivíduos mais sensíveis poderão desenvolver intoxicação por histamina e apresentar sintomas como: náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, hipotensão e em casos graves, em curto espaço de tempo, podem ocorrer dores torácicas e distúrbios respiratórios. A Figura 2 ilustra o mecanismo de intoxicação e possíveis fatores que potencializam a toxicidade da histamina.

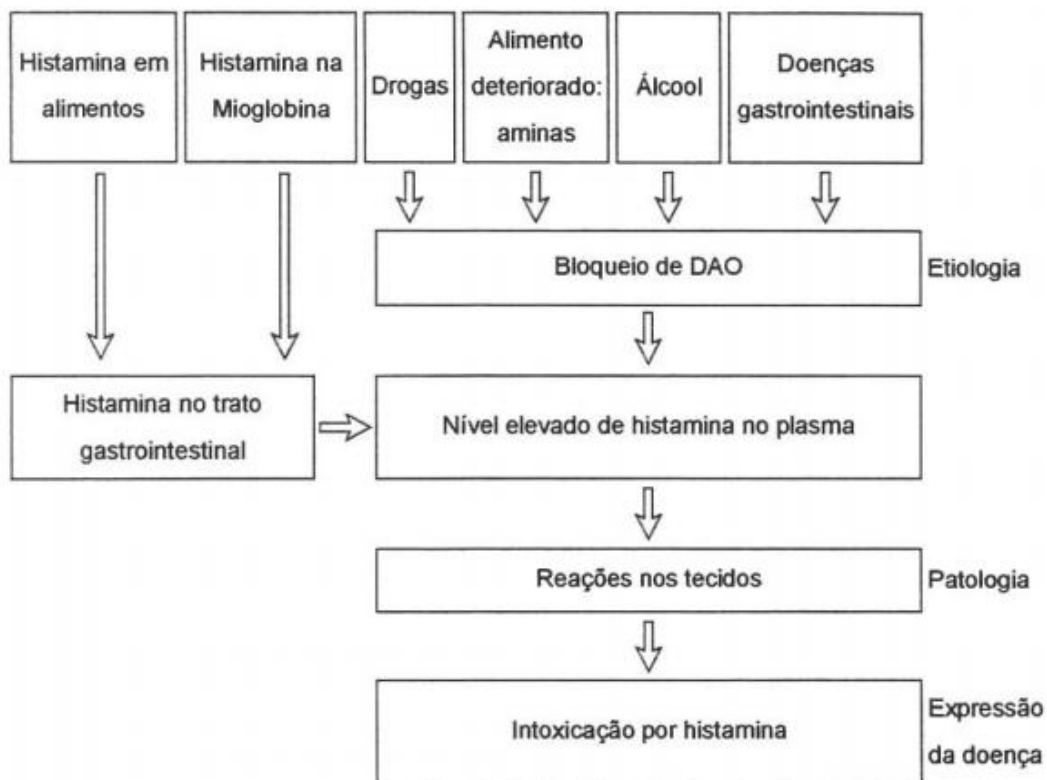


Figura 2- Mecanismo do processo de intoxicação por histamina.

Fonte: Sattler. 1986

Inúmeros alimentos já foram identificados como potenciais causadores de intoxicação histamínica, entre eles, vinhos, cervejas, peixes, produtos cárneos fermentados e queijos (GOMES et al., 2014).

O estudo de aminas biogênicas em alimentos apresenta correlação direta com a qualidade da matriz alimentar e com a saúde do consumidor. Para Lu *et al* (2010) os níveis de aminas biogênicas, entre elas, a histamina, têm sido utilizados como índice de qualidade da atividade microbiana indesejada, como também, um indicador de boas práticas de fabricação.

Uma vez produzida no alimento, esse composto químico dificilmente será eliminada pelo processo tecnológico aplicado (LORCA *et al*, 2001), nem mesmo pelo calor (TAO *et al.*, 2011) por isso, busca-se o desenvolvimento de métodos de detecção confiáveis e rápidos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e até mesmo, o desenvolvimento de biossensores, visando rastrear a presença de histamina nos alimentos. O estudo de bactérias formadoras de histamina mostra-se igualmente importante, pois é necessário conhecer a microbiota com potencial para formação dessa amina, o que pode estimar a contaminação.

Outras pesquisas visam o desenvolvimento de tratamentos que evitem a formação de aminas biogênicas, como a desenvolvida por Seta *et al* (2014), que propõe a utilização de extrato de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) para evitar sua formação em peixes.

Segundo Brasil (1997), espécies que produzem a histamina são as que podem vir a formar um nível maior que o de 100ppm desta amina em sua musculatura. A mesma portaria classifica como espécies formadoras de histamina, as pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombresocidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae*. A família *Scombridae*, a qual pertence à cavala, dividem-se em 15 gêneros e 48 espécies de peixes, nas quais, se encontram também o Bonito e o Atum. A maioria das espécies dessa família tem uma distribuição cosmopolita (BRASIL, 2000).

A intoxicação histamínica também tem sido denominada de intoxicação por escombrídeos por estar associada à intoxicação após o consumo de peixes da família *Scombridae* (SILVA, 2008). Segundo Huss (1997), trata-se de um problema a nível mundial e corresponde a uma doença de caráter benigno, com período de incubação curto, que pode variar desde alguns minutos até algumas horas, apresentando-se geralmente com curta duração. O Japão é o país que mais consome peixe no mundo, portanto, é o local onde se tem registrado o maior número de toxinfecções (HENERO, 2001).

No Brasil, surtos de intoxicação histamínica têm sido relatados em todo o território (EVANGELISTA, 2010; TAKEMOTO et al., 2014). Entre janeiro de 2007 e dezembro de 2009 foram relatados três surtos envolvendo atuns e afins e acometendo 25 pessoas. As amostras incriminadas continham histamina em teores de 3.701,8; 750,4 e 1.565,5 mg/kg.

De uma maneira geral, vários casos de intoxicação histamínica não são registrados, uma vez que, em muitas situações os sintomas podem ser leves, ter curta duração e as pessoas normalmente não procurarem suporte médico. Além disso, muitos médicos desconhecem a intoxicação histamínica, não diagnosticando de maneira correta e mesmo quando o diagnóstico é feito, muitos países não mantêm um registro oficial desses surtos. Sendo assim, não se conhece a incidência real de intoxicação histamínica (GLÓRIA, 2005).

Além de ser um problema de saúde pública o estudo de histamina em alimentos apresenta correlação direta com a qualidade da matriz alimentar, para Lu *et al* (2010), os níveis de aminas biogênicas têm sido utilizados como índice de qualidade da atividade microbiana indesejada. Nizimani et al. (2008) ressaltam que a histamina é considerada o mais importante indicador de frescor do pescado e Tan et al (2017) desenvolveram um método para avaliar a vida útil do camarão tigre-negro (*Penaeus monodon*) acompanhando ao longo do tempo, em temperatura ambiente, a variação no nível de histamina e de outras aminas biogênicas.

A temperatura é fundamental para o desenvolvimento de histamina em peixes. Evangelista (2010), mostrou que na região nordeste, as maiores ocorrências da amina nas amostras aconteceram nos meses de janeiro, julho e dezembro, com níveis variando de não detectado a 878,22 mg/kg. Esse o autor afirma que os resultados obtidos podem estar associado ao aumento da temperatura ambiente nesta época do ano proporcionando uma maior susceptibilidade ao crescimento microbiano e conseqüentemente, à formação de histamina. Torido (2012) constatou temperaturas inadequadas de armazenamento de pescado e acúmulo de histamina dentro de um curto período de tempo.

As principais linhagens de bactérias que geralmente são associadas com o desenvolvimento de histamina estão comumente presentes no ambiente aquático (FDA, 2011). Essas bactérias pertencem à microbiota natural das

brânquias, pele, intestino e da cavidade abdominal do peixe vivo de água salgada, onde não causam quaisquer danos as espécies, mas na fase de post-mortem, quando não mantidas as condições inadequadas de temperatura, elas podem produzir histamina no peixe.

Somando a isso, a manipulação inadequada dos alimentos contribui para o acesso e desenvolvimento de outros microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Essas bactérias, quando dotadas da enzima histamina descarboxilase atuam no aminoácido histidina, produzindo histamina (Figura 3).

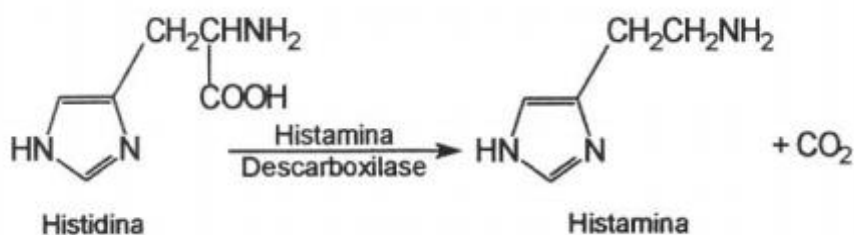


Figura 3- Formação de histamina nos alimentos. Fonte: Huss. 1993.

Carvalho et al, (1997), analisando a relação entre os microrganismos indicadores de qualidade higiênico sanitária e bactérias produtoras de aminas biogênicas, concluíram que existe relação direta entre o nível de *Enterococcus* e o de produtores de histamina. E ressalta a possibilidade da contagem de células viáveis de *Enterococcus* servir como indicador de risco da presença de níveis potencialmente perigosos de bactérias produtoras de histamina.

Silveira et al (2001), evidenciaram que as bactérias histamina- positiva pertenciam as famílias: *Vibrionaceae* (48,7%), *Pseudomonadaceae* (22,4%) *Enterobacteriaceae* (16,3%). Sendo *Morganella morganii*, da família *Enterobacteriaceae*, a espécie que demonstrou ter o maior potencial de descarboxilação dos aminoácidos, bem como, produzir histamina em níveis considerados tóxicos (>100mg/100ml). Björnsdóttir-Butler et al (2010), também determinaram *Morganella morganii* como a mais potente produtora de histamina entre os microrganismos avaliados, tendo uma produção de 2.880 a 6.353 ppm de histamina.

Andrade et al, (2008) avaliaram a microbiota total e as bactérias produtoras de histamina em camarões de cativeiro, através de contagens de microrganismos mesófilos, psicotróficos e histamina-positivos, e concluíram que a maioria dos microrganismos pertenciam à família *Enterobacteriaceae*, sendo as principais espécies: *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca* correspondendo a 60,8 % das bactérias produtoras de histamina.

Björnsdóttir-Butler et al (2010), desenvolveram uma técnica molecular para detecção de bactérias com alta produção de histamina e encontraram as seguintes espécies: *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola* e *Photobacterium damsela*. Esse estudo também demonstrou que o meio Niven pode detectar bactérias com baixa produção de histamina, o que não ocorreu com o método molecular.

Peralta e Júnior (2015), mostraram que a acumulação de histamina em peixe e leite pode atingir níveis potencialmente perigosos sob manipulação imprópria, pois, em seu estudo, foi observado que houve aumento proporcional do número de bactérias e nível de histamina formada no peixe ao longo do tempo, sob mesma temperatura.

Torido (2012), constatou que temperaturas inadequadas de armazenamento promove o acúmulo de histamina dentro de um curto período de tempo, além de, constatar que a presença de psicotróficas produtoras de histamina são capazes de produzir a amina ainda em baixas temperaturas.

3.3 Enterobactérias

Enterobactérias é como vulgarmente se chamam os membros da família *Enterobacteriaceae*, que inclui as bactérias Gram negativas na forma de bastonetes retos, não esporogênicos, anaeróbias facultativas e oxidase negativas (exceto o gênero *Plesiomonas*) ((BRENNER; FARMER III, 2005). Não são halofílicas, produzem catalase (exceto *Xenorhabdus* e algumas cepas de *Shigella dysenteriae*) e reduzem nitrato a nitrito (exceto algumas cepas de *Erwinia* e *Yersinia*). São microrganismos ubíquos e constituintes da microbiota intestinal normal da maioria dos animais, incluindo seres humanos. A ausência da atividade de citocromo-oxidase constitui uma importante característica, visto que, pode diferenciar as enterobactérias de outros bacilos Gram negativos.

Esses microrganismos são móveis dotados de flagelos peritríquios ou imóveis e podem crescer rapidamente em condições aeróbias ou anaeróbias, em uma variedade de meios de cultura (O'HARA, 2005). A maioria das espécies se desenvolve bem à temperatura de 37°C, entretanto, algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30°C e são frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas (ICMSF, 2000; HOLT et al. 1994).

As enterobactérias são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e no homem (HOLT *et al.*, 1994). A sua maioria habita os intestinos do homem e animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes infecciosos (TRABULSI & CAMPOS, 2002). Essas podem causar infecções intestinais e extraintestinais. As que causam infecções intestinais são geralmente chamadas de enteropatogênicas, incluindo categorias de *Escherichia coli*, todos os sorotipos de *Shigella*, sorotipos de *Salmonella* e alguns de *Yersinia* (CAMPOS & TRABULSI, 2002). Muitos membros desta família contribuem para a deterioração de alimentos (JAY et al., 2003) e sua presença é usada como indicador para possível contaminação fecal, decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento (TORNADIJO et al., 2001).

Escherichia é o gênero tipo da família, que inclui diversos outros gêneros de importância em alimentos, como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Pantoea*, *Pectobacterium* e *Yersinia*. Na família também se encontram as bactérias dos grupos coliformes totais e coliformes termotolerantes (SIQUEIRA, 1995). O número de gêneros e espécies da família tem aumentado continuamente, sendo 44 gêneros e 176 espécies em 2005 (BRENNER; FARMER III, 2005).

O gênero *Citrobacter* é facilmente encontrado no solo, água, esgoto e alimentos. São bacilos curtos, Gram negativos, com 1,0 µm de diâmetro e 2,0-6,0 µm de comprimento. Apresentam-se sozinhos ou aos pares, usualmente não possuem cápsula e são móveis por flagelos peritríquios. São anaeróbicos facultativos, possuem metabolismo respiratório e fermentativo, são oxidase negativa e catalase positiva, reduzem nitratos em nitritos e não descarboxilizam a lisina (HOLT et al., 1994).

Fermentam glicose com produção de ácido e gás, sob teste de vermelho de metila (VM), são positivos, e teste de Voges-Proskauer é negativo. A maioria das amostras de *Citrobacter freundii* produz abundância de H₂S em ágar triplice açúcar (TSI), a lactose é fermentada pela maioria das amostras de *C. freundii*, mas esta reação é freqüentemente demorada e também não produz indol. O gênero *Citrobacter* compreende as espécies *C. freundii*, *C. diversus* e *C. amalonaticus* (HOLT et al., 1994). Alguns sorotipos de *C. freundii* assemelham-se bioquimicamente com a *Salmonella* sp. e também aglutinam-se com o uso do antisoro polivalente O, podendo ser incorretamente identificados como *Salmonella* sp. (GILCHRIST, 1995).

O gênero *Enterobacter spp.* são espécies amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos. São bacilos curtos, Gram-positivos, com dimensões entre 0,6-1,0 µm x 1,2-3,0 µm, móveis por flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos, fermentam glicose com produção de ácido e gás. Os sorotipos possuem em sua maioria reação positiva no teste Voges-Proskauer e Citrato de Simmons, são negativas no teste do vermelho de metila e lisina positiva, com exceção de *Enterobacter gergoviae*. Não produzem H₂S, o citrato e o malonato são usualmente utilizados como única fonte de carbono e energia. A temperatura ótima para crescimento é 30°C, mas a maioria das amostras cresce a 37°C. A espécie *Enterobacter aerogenes* é móvel e não hidrolisa a uréia (HOLT et al., 1994). É encontrada na água, esgoto, terra e produtos leiteiros; já o *E. cloacae* é também encontrada em carnes.

O gênero *Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo e cresce a uma temperatura de 37°C. De modo geral a *E. coli* se apresenta como um bastonete delgado, pequeno ou comprido (1,1-1,5 µm x 2,6-6,0µm), aos pares, isolados ou formando cadeias. São oxidase negativa e catalase positiva, o teste de Voges-Proskauer é negativo e usualmente citrato positivo, não produz H₂S e a hidrólise da uréia é negativa (EVANGELISTA, 1994). Algumas cepas de *E. coli* produzem enterotoxinas e outros fatores de virulência, incluindo as invasivas e fatores de colonização sendo causadoras de doenças diarréicas. Esta espécie compreende um grande número de tipos sorológicos identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, os antígenos O, K e

H. São conhecidos atualmente 174 antígenos O, 100 antígenos K e 57 antígenos H, que, por convenção são designados por números arábicos colocados em seguida a cada letra (CAMPOS; TRABULSI, 2002).

O gênero *Edwardsiella* são pequenos bacilos curtos, Gram negativos, com cerca de 1 µm de diâmetro por 2-3µm de comprimento, anaeróbicos facultativos, móveis por flagelos peritríquios, catalase e oxidase positiva, Voges- Proskauer e citrato de Simmons negativo, lisina descarboxilase positiva, reduzem nitratos em nitritos. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, com exceção de *Edwardsiella ictaluri* que prefere baixas temperaturas. O reservatório natural de *Edwardsiella* sp. é o trato intestinal dos animais, geralmente os de sangue frio, como as cobras e tartarugas; que através das fezes disseminam o organismo no meio ambiente (HOLT *et al.*, 1994; BARTELT, 2000). *E. ictaluri* é uma bactéria associada a peixes, sendo um isolado raro nas análises clínicas (GILCHRIST, 1995).

O gênero *Hafnia*, tem como única espécie a *H. alvei*, anteriormente conhecida como *Enterobacter hafnia*. As características bioquímicas dessa espécie se assemelham àquelas das espécies de *Enterobacter*, sendo que, a *H. alvei* não produz ácidos a partir dos carboidratos: lactose, sacarose, mebilose, rafinose, adonitol, sorbitol, dulcitol e inositol. *H. alvei* pode ser diferenciada das espécies *Serratia* por não produzir lipase nem desorribonuclease. Observa-se também, que, ao contrário das outras *Enterobactériaceae*, esse micro-organismo desprende de um forte odor de fezes humanas (KONEMAN *et al.*, 2008).

O gênero *Klebsiella* mede 0,3µm de diâmetro e 0,6-6,0µm de comprimento, são arranjados sozinhos, aos pares ou em cadeias curtas. Possui cápsula, são imóveis, anaeróbicos facultativos, oxidase negativa e os sorotipos em sua maioria podem usar o citrato e glicose como única fonte de carbono. Fermenta a glicose com produção de ácido e gás, usualmente positivos no teste Voges-Proskauer, hidrolizam a uréia e produzem ornitina descarboxilase ou H₂S (HOLT *et al.*, 1994; OLIVEIRA, 1995). Este gênero compreende a *K. pneumoniae*, a *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, entre outras (HOLT *et al.*, 1994). A *K. pneumoniae* é normalmente encontrada no trato intestinal do homem e de animais, porém em menor número que a *Escherichia coli* e a *K. oxytoca* também está presente no

trato intestinal do homem e de animais, podendo ser isolada de vários processos patológicos e também de ambientes aquáticos e plantas (HOLT et al., 1994).

Com base em estudos de genética realizados por Brenner e colaboradores, em 1978, o microrganismo previamente denominado *Proteus morganii* foi reclassificado para o novo gênero de *Morganella* como *M. morganii*. G-1 e o G-2 são indistinguíveis do ponto de vista fenotípico, Jensen e colaboradores propuseram a divisão de *M. morganii* em apenas duas subespécies, com base na fermentação da trealose. As cepas de *M. morganii* incapazes de fermentar a trealose, são designados como *M. morganii* subesp. *Morganii*, enquanto as que são capazes de utilizá-la são denominadas *M. morganii* subesp. *Sibonii* (KONEMAN et al., 2008). De acordo com (KONEMAN et al., 2008), a *M. morganii* tem sido implicada como causa de diarreias.

Já o gênero *Plesiomonas* é composto por apenas uma espécie, *P. shigelloides*, sendo *P. shigelloides* a única oxidase positiva da família *Enterobacteriaceae*. O principal habitat de *P. shigelloides* é o ambiente aquático, incluindo a água doce e do mar (JANDA, 2005). A bactéria causa doença intestinal, sobretudo em indivíduos que vivem ou viajam para países tropicais e que ingerem alimentos marinhos crus e consomem água e/ou alimentos contaminados (ABBOTT, 2003).

O gênero *Proteus* está amplamente distribuído na natureza, ocorrem no intestino dos seres humanos e em um grande número de animais, em dejetos, solo e águas poluídas (HOLT et al., 1994). São bacilos curtos, Gram-negativos, com 0,4-08 µm de diâmetro e 1,0-3,0µm de comprimento, anaeróbicos facultativos, móveis por flagelos peritríquios, hidrolisam a uréia, oxidase negativos, catalase positivos, produzem H₂S, e são lactose e lisina descarboxilase negativos. Entre as espécies ocorrem variações nos testes de indol, Voges-Proskauer e citrato de Simmons, a temperatura ótima de crescimento é 37°C (HOLT et al., 1994; OLIVEIRA, 1995). Na nova classificação destas enterobactérias, o gênero *Proteus* passou a incluir somente *P. mirabilis* e *P. vulgaris*. O *P. morganii* foi transformado no gênero *Morganella* e o *P. rettgeri* passou a integrar o gênero *Providencia* (TOLEDO, 2002)

As espécies do gênero *Salmonella spp.* são agentes freqüentes de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, a diarréia é a manifestação mais comum da infecção por *Salmonella sp* que são *S. typhi* e *S. paratyphi*. Na maioria dos casos, esta diarréia é autolimitada, mas em indivíduos jovens ou idosos os sintomas podem ser mais severos (MIMS et al., 1999). Em função de sua capacidade de disseminação no meio ambiente, podem ser isoladas de locais variados e diferentes (águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras, ovos, etc.) e de diversas matérias primas alimentares. A dose infectante é geralmente de 15 a 20 células, relacionada à idade e estado de saúde do hospedeiro. O período de incubação varia de 6 a 48 horas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998). A febre tifóide é causada principalmente pela *S. typhi*. Estas podem ser disseminadas para corrente sangüínea e transportadas para muitos órgãos, incluindo o intestino. Os sintomas são febre, mal-estar, cefaléia, constipação, bradicardia e mialgia, podendo haver aumento do baço e fígado (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

3.4 LEGISLAÇÃO

A União Européia estabeleceu um nível aceitável de 100 a 200 mg/kg para histamina em peixes pertencentes às famílias *Scombridae* e *Scomberesocidae* (CE, 1991). No Mercosul o limite é de 100 mg/Kg em músculo das espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Coripineidae* e *Pomatocidae* (ABIA, 1997), valor adotado também pelo Brasil.

Entretanto, os Estados Unidos, visando assegurar maior proteção à saúde do consumidor, revisou o guia de conformidade para decomposição e intoxicação histamínica em 1995, e o Food and Drug Administration estabeleceu que o peixe pode ser considerado em decomposição quando o nível de histamina atingir 50 mg/kg no peixe fresco e 100 mg/kg no produto enlatado (FDA,1995). O mesmo órgão, ainda informa que o resfriamento rápido do peixe, imediatamente após a captura, é a melhor estratégia para limitar a formação de histamina em peixes.

Quanto à segurança microbiológica, a Portaria 12/2001 (BRASIL, 2001), publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, preconiza para pescado *in natura* ausência de *Salmonella spp* em 25 gramas

do alimento e contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo máxima de 10^3 UFC/g de alimento.

ARTIGOS DE RESULTADOS

Moreira, J.O.V; Nascimento, T.G.; Silva, M.C.D. SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA E BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA EM PEIXES CAVALA (*Scomberomorus cavala* Cuvier, 1829) E DOURADO (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816).

REVISTA QUE SERÁ SUBMETIDO: Brazilian Journal of Microbiology

RESUMO

Os peixes frescos são muito perecíveis e deterioram em decorrência da multiplicação bacteriana. Os ambientes de água doce ou marinha contém vários perigos potenciais naturais e o controle desses perigos deve ser considerado durante a captura e armazenamento desses alimentos. As enfermidades transmitidas por alimentos associadas a peixes, são causadas geralmente por bactérias patogênicas ou presença de substâncias químicas, como por exemplo, histaminas. A histamina é a amina biogênica termoestável que quando produzida por bactérias contaminantes e/ou da microbiota natural do pescado, não será eliminada durante o processamento. Tendo em vista os riscos de contaminação por perigos biológicos e químicos, este estudo propôs avaliar a qualidade microbiológica com base na legislação em vigor e determinar o perfil de bactérias produtoras de histaminas em peixes *in natura*. Foram coletadas 40 amostras (sendo 20 de peixe cavala e 20 de peixes dourado) em diferentes pontos comerciais de Maceió – AL para a quantificação de *Staphylococcus* coagulase positivo, pesquisa de *Salmonella* sp e determinação de bactérias produtoras de histamina. Empregou-se metodologia preconizada por APHA, para avaliação microbiológica e o meio Niven com o Sistema BacTray para identificação das bactérias produtoras de histamina. De acordo com os resultados obtidos, constatou-se que as 40(100%) amostras analisadas apresentaram-se próprias para consumo, segundo a legislação vigente, com ausência de *Salmonella* sp e contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, <10UFC/g. Quanto a prevalência de bactérias produtoras de histamina foram identificadas as seguintes espécies: 27% de *Morganella morganii*, 15,4% *Citrobacter diversus* (*koseri*), 11,5% *Proteus vulgaris*, 11,5% *Klebsiella oxytoca*, 11,5% *Enterobacter asburiae*, 3,8% *Citrobacter freundii*, 3,8% *Enterobacter cloacae*, 3,8% *Klebsiella ozonae*, 3,8% *Escherichia coli*, 3,8% *Citrobacter amaloniticus* e 3,8% *Enterobacter sakazakii*. Conclui-se que a presença dessas enterobactérias podem comprometer a qualidade e segurança desse pescado, pois a possível presença de histamina acarretará risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Peixes, avaliação microbiológica, bactérias produtoras de histamina, *Enterobacteriaceae*.

ABSTRACT

Fresh fish are very perishable and deteriorate as a result of bacterial multiplication. Freshwater or marine environments contain several potential natural hazards and the control of these hazards should be considered during the capture and storage of these foods. Foodborne illnesses associated with fish are usually caused by pathogenic bacteria or the presence of chemicals, such as histamines. Histamine is the thermostable biogenic amine which when produced by contaminating bacteria and / or the natural fish microbiota will not be eliminated during processing. Considering the risks of contamination due to biological and chemical hazards, this study proposed to evaluate the microbiological quality based on the legislation in force and to determine the profile of bacteria producing histamines in fresh fish. A total of 40 samples (20 cavala fish and 20 dourado fish) were collected at different commercial points from the sea coast of Maceió - AL and sent in isothermal boxes to the Laboratory of Control and Food Quality of the Federal University of Alagoas for quantification of *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* sp and determination of histamine-producing bacteria. A methodology recommended by APHA for microbiological evaluation and the Niven medium with the BacTray System for the identification of the histamine-producing bacteria were used. According to the results obtained, the 40 (100%) samples analyzed were suitable for consumption, according to the current legislation, with absence of *Salmonella* sp and *Staphylococcus* coagulase positive, <10UFC / g. As for the prevalence of histamine-producing bacteria, the following species were identified: 27% *Morganella morganii*, 15.4% *Citrobacter diversus* (*koseri*), 11.5% *Proteus vulgaris*, 11.5% *Klebsiella oxytoca*, 11.5% *Enterobacter asburiae*, 3.8% *Citrobacter freundii*, 3.8% *Enterobacter cloacae*, 3.8% *Klebsiella ozonae*, 3.8% *Escherichia coli*, 3.8% *Citrobacter amaloniticus* and 3.8% *Enterobacter sakazakii*. It is concluded that the presence of these *Enterobacteriaceae* can compromise the quality and safety of this fish, as the possible presence of histamine will risk the health of the consumer.

Key words: Histamine, fish, microbiological evaluation, histamine-producing bacteria, *Enterobacteriaceae*.

1. INTRODUÇÃO

Entre o pescado, os peixes são os mais consumidos (BRASIL, 2014) e sua procura é estimulada pela divulgação de estudos recentes apontando que um aumento na frequência de sua ingestão está associado a uma melhor qualidade de vida (SARTORI et al., 2012). Em 2014, o total mundial da produção de pesca de captura foi de 93,4 milhões de toneladas, das quais, 81,5 milhões de toneladas procedentes de águas marinhas e 11,9 milhões de toneladas de águas continentais (FAO, 2016). No Brasil, a produção no mesmo ano correspondeu a 235.527 toneladas e considera-se um aumento significativo de 104% na pesca e aquicultura até 2025, devido ao aumento no consumo e investimentos no setor (FAO, 2016).

Na costa marítima do Estado de Alagoas, a pesca é uma importante atividade econômica, pois dela depende a sobrevivência de muitos pescadores e os pratos à base de peixe e marisco não somente fazem parte da dieta da população litorânea como também são muito apreciados pelos turistas (MENEZES et al., 2009). Apesar de sua importância econômica e nutricional, atenção especial deve ser dada ao consumo de peixes, pois estes apresentam características físico-químicas e microbiológicas que os tornam o produto de origem animal mais susceptível ao processo de deterioração, devido a sua elevada atividade de água, alto teor de nutrientes disponíveis para atividade microbiana e pH próximo da neutralidade (TAVARES, 2012). Outros motivos pelos quais os peixes são altamente perecíveis estão relacionados à estrutura coloidal da sua proteína muscular, com grande quantidade de substâncias extrativas nitrogenadas livres, como aminoácidos e o óxido de trimetilamina e ao rápido desenvolvimento do *rigor mortis* (MUJICA; LIMA; CARNEIRO, 2014).

A falta de cuidados na conservação de peixes, principalmente, quando armazenados em temperaturas inadequadas e manipulação sem higiene, pode levar à formação de metabólitos tóxicos, como as aminas biogênicas (TAO et al., 2011). A temperatura entre 20^oC e 37^oC é considerada ótima para formação de aminas biogênicas por bactérias mesófilas, enquanto que, há diminuição dessa produção em temperaturas abaixo de 5^oC ou acima de 40^oC (EFSA, 2011). Essas aminas são produzidas por microrganismos da microbiota

desses alimentos, a partir de aminoácidos como histidina, devido a falhas na temperatura de conservação (devem ser mantidos abaixo de 4 a 5^oC).

Teores elevados dessas substâncias podem causar intoxicação alimentar, merece destaque a histamina por ser a amina mais tóxica e a que está mais ligada aos casos de surtos (LADERO et al., 2010). O conteúdo de histamina em pescado recém-capturado é muito baixo e seu aumento está relacionado à contaminação dos peixes após a captura, processo de deterioração, manipulação inadequada do produto em temperaturas altas de estocagem e condições precárias de higiene (VECIANA-NÓGUES et al., 1997).

A histamina é um potente mediador de numerosas reações fisiológicas, atuando como neurotransmissor no sistema nervoso central e na função vasoativa, dilatando os pequenos vasos sanguíneos (CRIADO, 2010). Quando ingerida em quantidades elevadas, ou quando a atividade das enzimas catabolizadoras for inibida, indivíduos mais sensíveis poderão desenvolver intoxicação alimentar por histamina e apresentar sintomas como: náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, hipotensão, e em casos graves, dores torácicas e distúrbios respiratórios (LADERO, 2010).

Essa intoxicação foi inicialmente denominada de “escombróide”, por estar associada ao consumo de peixes da família *Scombridae* (SILVA, 2008), hoje, sabe-se que vários alimentos já foram identificados como potenciais causadores de intoxicação histamínica (GOMES et al., 2014), entre eles, peixes das mais diversas famílias, produtos de peixe, produtos lácteos, carnes fermentadas e vegetais (LINHARES et al., 2012).

Vale ressaltar, que o processo de descarboxilação do aminoácido histidina se deve à atividade de algumas espécies bacterianas presente no pescado, uma vez que esta enzima não se encontra naturalmente nos tecidos dos mesmos. As enterobactérias são as mais ativas na formação de histamina, quando presentes também indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Foi constatado que nem sempre o peixe contaminado com elevados teores de histamina apresenta sinais aparentes de deterioração, ainda que, sua toxicidade possa afetar a saúde do consumidor (MORENO et al., 2003). Dessa forma, o teor de histamina pode ser usado como índice de qualidade dos alimentos, pois a partir dele é possível deduzir atividade microbiana indesejada e as condições higiênico-sanitárias dos produtos (LU et

al ., 2010). Vários surtos de intoxicação histamínica têm sido relatados no país, daí ressalta-se a importância da investigação de bactérias produtoras de histamina nos alimentos (EVANGELISTA, 2010; TAKEMOTO et al., 2014; TORIDO et al., 2014).

Nesse contexto, a pesquisa objetivou avaliar a segurança microbiológica e determinar o perfil de bactérias produtoras de histamina em peixes dourado e cavala comercializados em Maceió - AL.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Aquisição das amostras

As amostras foram adquiridas nos principais pontos de comércio de peixe em Maceió-AL: Mercado da Produção, Balança da Pajuçara, Balança de Ponta Verde, Balança de Jaraguá e Feirinha do Village 2. De cada ponto, foram adquiridas amostras de peixes dourado e cavala *in natura*, pesando aproximadamente 300g. Os peixes eram recém chegados do barco de pesca e estavam devidamente armazenados em caixas isotérmicas com gelo a temperaturas entre -0,5 °C à -2°C. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e transportadas em caixa isotérmica com gelo para o Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Faculdade de Nutrição da UFAL, para análise imediata.

Análises microbiológicas

Conforme recomendação da Portaria 12/2001 (BRASIL, 2001), foram avaliadas a contagem de *Staphylococcus* coagulase (+) (UFC/g) e pesquisa de *Salmonella* sp nas amostras de peixes *in natura*. Além disso, realizou-se a contagem de Enterobactérias utilizando o meio Agar Vermelho Violeta Bile com Glicose (VRBG) e contagem de Enterobactérias produtoras de histamina no meio Agar Niven, (1981). Posteriormente, colônias isoladas do meio Agar Niven foram confirmadas no caldo Niven modificado e em seguida identificadas bioquimicamente utilizando o Sistema Bactray.

Preparo das diluições seriadas

Pesou-se 25g da amostra em saco estéril, adicionou-se 225 ml do meio APT (água peptonada tamponada) e homogeneizou-se em Stomocker (diluição 10^{-1}). A partir dessa diluição, transferiu-se 1,0 ml para tubo de ensaio contendo 9ml de APT (diluição 10^{-2}) e sucessivamente obteve-se as demais diluições; 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} .

Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Empregou-se metodologia de contagem direta em placas (UFC/g) segundo Lancette; Bennett, (2001). Com a primeira diluição (10^{-1}), inoculou-se 1,0mL da amostra, na superfície de placas de Agar Baird-Parker (BP), previamente preparadas e secadas, distribuindo o volume por quatro placas, três com 0,3ml e uma com 0,1ml. Das outras diluições (10^{-2} e 10^{-3}), inoculou-se 0,1 mL da amostra. O inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski e em seguida incubou-se as placas em estufa a 35°C /24h. Após esse tempo verificou-se o crescimento de colônias típicas (negras, brilhantes, com anel opaco, rodeado por um halo claro transparente) e realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama do alimento.

Pesquisa de *Salmonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp, foi realizada segundo Andrews; Hammack, (2006). Pesou-se 25g da amostra em saco de Stomacher e adicionou 225ml de solução peptonada tamponada (pré-enriquecimento). Em seguida, homogeneizou-se em stomacher e incubou-se a 36°C /24 horas. Posteriormente, alíquotas de 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas foram inoculadas para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e 1,0 mL para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina. A seguir incubaram-se os tubos a $41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em banho-Maria por 24 horas. Após o período de incubação realizou-se o plaqueamento em superfície de placas contendo Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e *Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose* (BPLS) e incubaram-se à $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. Em seguida, foram selecionadas colônias típicas nas placas de Agar XLD (colônias com coloração rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente) e de Ágar BPLS (colônias incolores ou de cor rosada, entre translúcidas à ligeiramente

opacas) e submetidas às provas bioquímicas de identificação em agar TSI, agar LIA e meio de SIM.

Contagem de Enterobactérias no Agar VRBG

Empregou-se a técnica de plaqueamento em profundidade (UFC/g) segundo Kornacki; Johnson, (2001). Seleccionaram-se as três primeiras diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), inoculou-se em placas contendo Ágar VRBG e após a completa solidificação do meio, cobriu-se com sobrecamada de 8 mL do mesmo meio. Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 35°C /18-24h.

Após incubação, seleccionaram-se placas com contagem entre 15 a 150 colônias com características típicas de enterobactérias (colônias vermelho púrpura, com 0,5mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares) e realizou a contagem em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama do alimento.

Contagem de bactérias produtoras de histamina no Meio Agar Niven

As mesmas amostras semeadas no Agar VRBG foram também semeadas no meio Agar Niven (1981), o qual era composto de: Triptona 0,5%, Extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2,7%, NaCl 0,5%, CaCO₃ 0,1%, ágar 2,0%, e 0,006% de púrpura de bromocresol. Utilizou-se esse meio enriquecido com o aminoácido histidina com objetivo de favorecer o crescimento das enterobactérias que poderiam utilizar esse nutriente realizando a descarboxilação da histidina e formação da histamina. Dessa forma teríamos e exposição da enterobactéria pela mudança da coloração do meio de amarelo para o púrpura.

A técnica empregada foi a mesma utilizada na contagem de enterobactérias do Agar VRBG, inoculando 1,0mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) agora em placas contendo Agar Niven com adição de sobrecamada de 8mL do mesmo meio após completa solidificação. Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 35°C /24-72h. A contagem de colônias típicas (roxas e presença de um halo arroxeadado, indicando a alcalinização do meio pela presença da amina) também foi realizada conforme descrita no item anterior. Os resultados foram expressos em UFC/g.

Teste de confirmação de bactérias produtoras de histamina no Meio Niven Modificado

Com objetivo de confirmar as colônias isoladas no meio Agar Niven, as mesmas foram inoculadas em tubos contendo Caldo Niven modificado com tubo de Durhan invertido, o qual foi formulado com os seguintes ingredientes : Triptona 0,5%, Extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2,7%, NaCl 0,5% e 0,02% de Púrpura de bromocresol. Somente as cepas histamina-positivas do Agar Niven foram inoculadas nesse Caldo Niven modificado e incubado em estufa a 35°C por 24h. Após esse período, o teste era considerado positivo quando ocorresse presença de gás no tubo de Durhan e coloração roxa do meio, conforme ilustra figura 1.

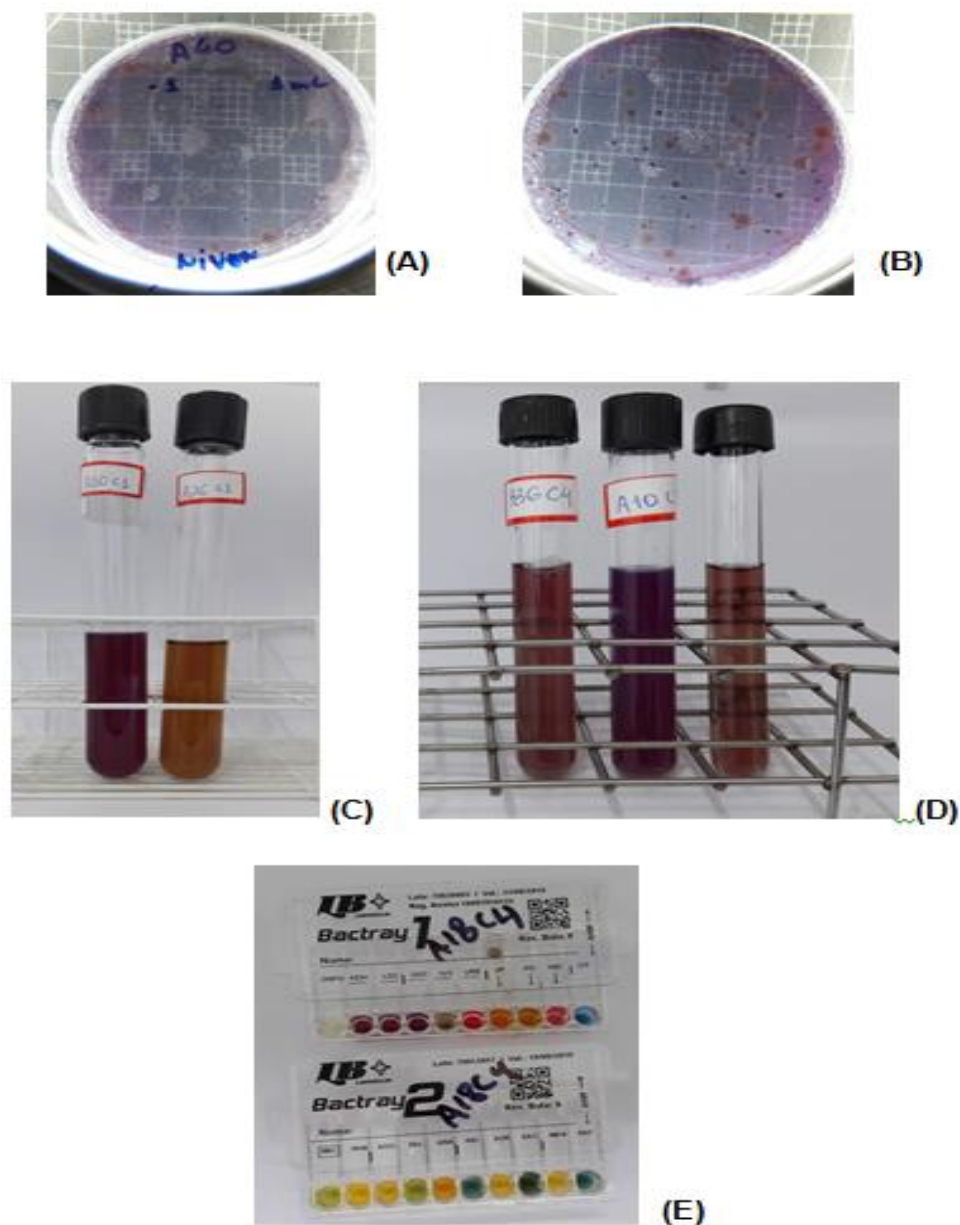


Figura 1- Sequência de identificação das bactérias histamina positiva: (A) e (B) Placa de meio Niven com colônias características (presuntivo), (C) e (D) teste confirmativo, com produção de gás e coloração roxa do meio, (E) kit de testes bioquímicos para identificação.

Identificação Bioquímica das Enterobactérias no Sistema Bactray

Para identificação das enterobactérias produtoras de histamina, utilizou-se o Kit Bactray (Figura 3). As culturas puras confirmadas no Caldo Niven foram semeadas em ágar nutriente pela técnica de esgotamento em estrias e incubadas a 35⁰C por 18-24 horas em câmara úmida. Após esse tempo

realizou-se o teste de oxidase e em seguida utilizou-se o Kit do Sistema BacTray que compreende os seguintes testes bioquímicos: testes de ONPG, Arginina, Lisina, Ornitina, H₂S, Uréia, VP, PD, Indol, Citrato, Malonato, Rhamnose, Adonitol, Salicina, Arabinose, Inositol, Sorbitol, Sacarose, Manitol e Rafinose.

A inoculação das culturas no Sistema BacTray foi realizada segundo recomendações do fabricante. Uma colônia pura da placa de Agar Nutriente foi homogeneizada em água estéril e com turvação correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland, transferiu-se 1,0 mL desse inóculo para o kit BacTray e incubou por 18-24 horas em câmara úmida. Após o período de incubação, adicionaram-se os reagentes conforme instruções do fabricante e realizou-se a leitura e cálculo pelo software online da Laborclin para determinação das espécies.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à segurança microbiológica, as 40 (100%) amostras de peixes mostraram-se seguras, com ausência de *Salmonella* spp em 25 gramas do produto e contagem de *Staphylococcus* coagulase (+), <10 UFC/g, estando assim, de acordo com os padrões da legislação vigente (Tabela 1).

Tabela 1 – Análises microbiológicas para peixes *in natura* com base no padrão microbiológico estabelecido pela legislação vigente.

Microrganismo	RDC 12/2001*	Peixe Cavala	Peixe Dourado
<i>Staphylococcus</i> coagulase (+)	10 ³	<10	<10
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausência	Ausência

*Portaria N.12 de 2001 - Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos - DINAL.

Essa baixa contagem de *Staphylococcus* coagulase (+) encontrada nas amostras avaliadas, pode ser explicado devido ao gênero *Staphylococcus*, ser

considerado um fraco competidor quando presentes em alimentos *in natura* (JAY, 2005). Outros pesquisadores analisando peixes (caranga, dourado e tucunaré) comercializados em feiras livres de Palmas, TO, também encontraram baixas contagens, <10UFC/g de *Staphylococcus* coagulase (+). Entretanto, os mesmos autores evidenciaram a presença de *Salmonella* no peixe tucunaré e ausência nos peixes dourado e caranga analisados (MUJICA et al., (2014). Bartolomeu et al., (2011) também encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, em filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*), com contagem de *Staphylococcus* abaixo dos limites que preconiza a legislação brasileira.

A presença ou ausência de *Salmonella* sp nas amostras avaliadas, deve-se a manipulação do pescado durante a comercialização e/ou reflete a população microbiana das águas de captura. Vale ressaltar, a importância da pesquisa deste patógeno, por tratar-se de um enteropatógeno, capaz de provocar gastroenterite principalmente em indivíduos com o sistema imunológico comprometido (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Em pesquisa realizada com sushis comercializados em restaurantes de Belo Horizonte- MG, foi evidenciado 60% de amostras de salmão com contagem de *Staphylococcus* coagulase (+) acima do permitido pela legislação vigente e 40% apresentaram presença de *Salmonella* sp (ZEFERINO et al., 2013).

Quanto à contagem de enterobactérias foi constatado que nas 40 amostras de peixes *in natura*, houve uma variação de 0 a 10^5 UFC/g no Agar VRBG, sendo o maior número de amostras (13) com contagens entre 10^3 e 10^4 UFC/g, enquanto que, no Agar Niven essa contagem variou de 0 a 10 UFC/g, sendo que, a maioria das amostras (27) não cresceu neste meio (Tabela 2).

Esse fato deve-se provavelmente a alta seletividade do meio Niven que é enriquecido com aminoácidos histidina, favorecendo o crescimento dessas bactérias.

Tabela 2- Distribuição do número de amostras de peixes *in natura* segundo a contagem de enterobactérias nos meios Agar VRBG e Agar Niven.

Contagem <i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/g)	N° amostras	
	Agar VRBG	Agar Niven
0	3	27
1 – 10	0	13
10 – 10 ²	1	0
10 ² – 10 ³	11	0
10 ³ – 10 ⁴	13	0
10 ⁴ – 10 ⁵	12	0

Resultados semelhantes foram obtidos Leitão et al., (1997) quando utilizaram o Meio Niven para análise microbiológica superficial do peixe PACU (*Piaractus Mesopotamicus*), e encontraram contagens reduzidas dessas bactérias, abaixo de 10UFC/cm², identificando cepas de *Plesiomonas shigelloides* e *Vibrio fluvialis*.

Diversos pesquisadores concordam que a microbiota do pescado reflete a água onde esses animais vivem, visto que, os tecidos internos de um peixe sadio são estéreis (NICKELSON II; MCCARTHY; FINNE, 2001).

A microbiota dos peixes normalmente é encontrada em três lugares: na superfície externa, nas guelras e nos intestinos. Ressalta-se a importância das condições higiênico-sanitárias adequadas durante toda a cadeia produtiva, que vai desde a captura até a distribuição ao consumidor final, no intuito de garantir a qualidade do pescado (HAYES, 1993). Germano, (2003) salientaram também o papel desempenhado pelo manipulador de alimentos como origem do problema para os consumidores e grandes responsáveis pela contaminação cruzada.

Pode-se observar que das 40 amostras analisadas, 13 apresentaram contaminação, sendo 4(20%) de peixe cavala e 9(45%) de peixe dourado. Segundo Taylor, 1986, o peixe cavala, da família *Scombridae*, é a espécie mais implicada em surtos de intoxicação histamínica. Os microorganismos

C. amaloniticus, *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *M. morganii* e *P. vulgaris* foram identificados tanto no peixe cavala como no peixe dourado.

Nas 13 amostras de peixes contaminadas, foram isoladas 46 cepas produtoras de histamina no teste presuntivo, e somente 27 cepas foram confirmadas como bactérias produtoras de histamina no Caldo Niven e submetidas à identificação da espécie no sistema bactray (Tabela 3).

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos quanto ao perfil microbiológico em relação à presença de bactérias histamina positivas.

Tabela 3- Distribuição do número de amostras de peixes com presença de bactérias produtoras de histamina e identificação das espécies.

Procedência	Nº amostras analisadas	Nº amostras (+) para bactérias produtoras de histamina no agar niven	Espécies identificadas no sistema bactray
Peixe cavala	20	4 (20%)	<i>C. amaloniticus</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>M. morganii</i> e <i>P. vulgaris</i>
Peixe dourado	20	9 (45%)	<i>C. freundii</i> , <i>C. amaloniticus</i> , <i>C. diversus</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. sakazaki</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>M. morganii</i> e <i>P. vulgaris</i>

Após realização de todas as provas bioquímicas (ONPG, Lisina, Ornitina, Uréia, Indol, Citrato, Malonato, Rhamnose, Salicina, Arabinose, Sorbitol, Sacarose e Manitol), 11 espécies foram identificadas: *C. freundii*, *C. amaloniticus*, *C. diversus*, *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. sakazaki*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *M. morganii* e *P. vulgaris*. Todas pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* (Tabela 4).

Tabela 4- Comportamento das cepas identificadas como bactérias produtoras de histamina com relação aos testes bioquímicos.

Nº de cepas produtoras de histamina isoladas no teste presuntivo*	Nº de cepas testadas p/ identificação do teste confirmativo**	Teste bioquímico realizado	Cepas com reação usual (+) Nº	Espécies identificadas no sistema bactray
46	27	ONPG	<u>22 (81,5%)</u>	11
		Arginina	10 (37%)	
		Lisina	14 (51,8%)	
		Ornitina	15 (55,5%)	
		H ₂ S	9 (33,3%)	
		Uréia	18 (66,7%)	
		VP	3 (11,1%)	
		PD	11 (40,7%)	
		Indol	20 (74%)	
		Citrato	19 (70,4%)	
		Malonato	17 (63%)	
		Rhamnose	16 (59,2%)	
		Adonitol	9 (33,3%)	
		Salicina	15 (55,5%)	
		Arabinose	15 (55,5%)	
		Inositol	7 (25,9%)	
		Sorbitol	14 (51,8%)	
		Sacarose	16 (59,2%)	
Manitol	16 (59,2%)			
Rafinose	11 (40,7%)			

*Agar Niven; **Caldo Niven

A enterobactéria de maior prevalência nas amostras de peixes analisadas foi a *Morganella morganii*, isolada de 8 (29,7%) amostras (Tabela 4). De acordo com dados da literatura, a espécie *Morganella morganii* é

considerada a que apresenta maior potencial para produção de histamina em relação às demais (SILVEIRA et al., 2017; BJORNSDÓTTIR-BUTLER 2010).

Analisando diversos tipos de peixes, Torido (2014) detectou o gênero *Photobacterium*, como mesófilo predominante (42,7%) e *Morganella morganii* como a segunda espécie mais abundante (23%). CHUNG-SAINT et al., (2014) analisaram peixes frescos e produtos salgados da espécie mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) e encontraram *Raoultella ornithinolytica*, como o principal produtor de histamina nos produtos salgados e *Proteus vulgaris* no alimento fresco. Semelhantemente *P. vulgaris*, também foi identificado nessa pesquisa.

Tabela 5- Espécies de bactérias produtoras de histamina isoladas de amostras de peixes “in natura” comercializados em Maceió – AL.

<i>Enterobacteriaceae</i>	Nº Isolados	%
<i>Morganella morganii</i>	8	29,7%
<i>Citrobacter diversus</i>	4	14,8%
<i>Proteus vulgaris</i>	3	11%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	11%
<i>Enterobacter asburiae</i>	3	11%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	3,7%
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3,7%
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	3,7%
<i>Escherichia coli</i>	1	3,7%
<i>Citrobacter amaloniticus</i>	1	3,7%
<i>Enterobacter sakazaki</i>	1	3,7%

As enterobactérias *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris* e o gênero *Klebsiella* fazem parte da flora dos peixes e são as principais produtoras de histamina (CHANG et al., 2008; CHEN et al., 2010; LEE et al. 2013). Sua

presença indica que houve abuso de temperatura em alguma(s) das etapas da cadeia de frio do pescado.

Já a presença de enterobactérias do gênero *Enterobacter*, indica a ocorrência de condições higiênicas sanitárias insatisfatórias, desde as águas poluídas onde a pesca é realizada à comercialização. Esse gênero correspondeu a 18,4% dos isolados e também foram encontrados em camarão de captura (ANDRADE et al., 2008) e em peixe mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) fresco e em seus produtos salgados (CHUNG-SAINT et al., 2014).

Huang et al. (2010) analisaram peixes salgados e constataram que 30,4% das amostras estavam com níveis de histamina acima do permitido pela FDA, sendo a enterobactéria do gênero *Enterobacter* a responsável pela maior contaminação nessas amostras.

Andrade et al. (2008) avaliaram a presença de histamina em camarões de cativeiro e concluíram que a maioria dos microrganismos presentes nessas amostras pertenciam à família *Enterobacteriaceae*, sendo as principais espécies *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca* correspondendo a 60,8% das bactérias produtoras. Ambas as espécies foram também encontradas no estudo correspondendo respectivamente a 4 e 11% dos isolados.

A espécie *Citrobacter freundii* isolada do peixe dourado correspondeu a 3,7% dos isolados (Tabela 4), em concordância com os achados de Hsu et al., 2009 em peixe-leite (*Coryphaena hippurus*) e com Huang et al., 2010 em peixes salgados. Torido, 2014, ao avaliar diversas espécies de peixes frescos também isolou *Citrobacter freundii*. Muitos patógenos estão relacionados com a qualidade da água ou até mesmo do gelo utilizado na conservação e ou procedimento pós-captura (HUSS, et al., 2000)

É importante salientar, que o pescado não conservado adequadamente sob refrigeração, perdendo o frescor, poderá ocorrer a produção de histamina por enterobactérias e se esse pescado contendo histamina for consumido, pode ocorrer o desencadeamento de sintomas, como, erupções cutâneas, dores de cabeça, vômitos, diarreia e em indivíduos mais sensíveis choque anafilático.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que as amostras de peixes cavala e dourado apresentam-se próprias para consumo, entretanto a presença de enterobactérias produtoras de histamina pode comprometer a qualidade e segurança desse pescado, pois a possível presença de histamina produzida por essas bactérias acarretará risco à saúde do consumidor.

5. REFERÊNCIAS DO ARTIGO

ANDRADE, C.D.S. et al. Determinação da microbiota histamina positiva em camarão Histamina. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, n. 67, p. 46-51, 2008.

BARTOLOMEU, D. A. F. S.; DALLABONA, B. R.; MACEDO, R. E. F.; KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) Archives of Veterinary Science v.16, n.1, p.21-30, 2011.

BJORNSDÓTTIR-BUTLER, B. et al. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. **International Journal of Food Microbiology**, n. 139, p. 161-167, 2010.

BRASIL. Ministério da saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2^o edição. Brasília: Ministério da saúde, 2014a. 156.p.:ll.

BRASIL. RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Brasília, DF: ANVISA, 2001.

CHANG, S. C.; KUNG, H. F.; CHEN, H. C.; LIN, C. S.; TSAI, Y. H. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. **Food Control**, v.19, p.16-21, 2008.

CHEN, H. C.; HUANG, Y. R.; HSU, H. H.; LIN, C. S.; CHEN, W. C.; LIN, C. M. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. **Food Control**, v.21, p.13-18, 2010.

CHUNG-SAINT, L.; HSIN-CHUAN, T.; CHIA-MIN, L.; CHUN-YUNG, H.; HSIEN-FENG, K.; YUNG-HSIANG, T. Histamine content and histamine-forming bacteria in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) fillets and dried products, **Food Control**, v.42, p. 165-171, 2014.

CRIADO, P. R et al. Revisão Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Editora Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 2, n. 85, p. 195- 210, 2010.

EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods. **European Food Safety Authority Journal**, v. 9, p.93, 2011

EVANGELISTA, W.P. **Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009**. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia, UFMG. 2010. 70 p. (Dissertação, mestrado em Ciência de Alimentos).

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA): 2016. Roma, p.81, 2016. Disponível em: < www.fao.org/3/a-i3720S/index.html > Acessado em: 20/05/2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GERMANO, Maria Izabel Simões. **Treinamento de Manipuladores de Alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde**, São Paulo: Livraria Varela, 2003.

GOMES, M. B. et al. O Risco das Aminas biogênicas nos Alimentos. **Revista Ciência e saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1123-1134, abril de 2014.

HSU, H. H.; CHUANG, T. C.; LIN, H. C.; HUANG, Y. R.; LIN, C. M.; KUNG, H. F. Histamine content and histamine-forming bacteria in dried milkfish (*Chanos chanos*) products. **Food Chemistry**, v.114, p.933–938, 2009.

HUANG, Y. R. et al. Histamine level and histamine-forming bacteria in dried fish products sold in Penghu Island of Taiwan. **Food Control**, v. 21, p. 1234-1239, 2010.

HUSS, H. H.; REILY, A.; EMBAREK, P. K. B. Prevention and control of hazards in seafood. **Food Control**, Guildford, v.11. p.149-156, 2000.

JAY, J. M. Microbiologia de alimentos. Porto Alegre: Artmed, p. 347-361, 2005.

KORNACKI, J.L. & JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P., AND K. ITO (ed), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.,Chaper 8, p.69-82, 2001.

LADERO, V.; CALLES-ENRÍQUEZ, V.; FERNANDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition and Food Science**, n. 6, v.2, p. 145-156, 2010.

LANCETTE, G. A.; BENNET, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In DOWNES, F. P., and K. ITO (ed.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C., Chapter 39, p.387-403, 2001.

LEE, Y. C., Lin, C. M., Huang, C. Y., Huang, Y. L., Chen, H. C., Huang, T. C., Determination and frying loss of histamine in striped marlin fillets implicated in a foodborne poisoning. **Journal of Food Protection**, v. 76, p.860-866, 2013.

LEITAO, M. F.F. et al. Aterações químicas e microbiológicas em PACU (*piaractus mesopotamicus*) armazenado sob refrigeração a 5°C. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 17, n. 2, p. 160-166, 1997.

LINARES, D. M.; Del Rio, B.; LADERO, V.; MARTINEZ, N.; FERNANDEZ, M.;

LU, S. et al. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. **Food Control**, v. 4, n. 21, p. 444-449, 2010.

MARTIN, M. C. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p.180, 2012.

MENEZES, M. E. D. S. et al. Valor nutritivo de peixes da costa marítima de Alagoas, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** , São Paulo, v. 1, n. 68, p. 21-28, 2009. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/6972>>. Acessado em: 07/06/ 2017.

MORENO R.B; TORRES, E.F.S; NETO, J.M.M. Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo. **REVENET DTA**, v. 5, n. 3, p.151-159, 2003.

MUJICA, P. I. C.; LIMA, M.M.; CARNEIRO, P. H. Avaliação da qualidade microbiológica de peixes comercializados nas feiras livres de Palmas, TO. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 28 n. 236/237,2014.

NERY, L. C., MATTOS, A. S., MENEZES, P. R. V.; COUTINHO, L. C.; TANCREDI, R. C. P. Condições higiênico-sanitárias e rotulagem de pescados expostos à venda em supermercados do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 150, p.154-155, 2007.

NIVEN, C. F.; JEFFREY, M. B.; CORLETT, D. A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 321-322, 1981.

SARTORI, I.; NAPOLITANO, A.; VOSS, K. Net zero energy buildings: A consistent definition framework. **Energy and Buildings**, v. 48, p. 220-232, 2012.

SILVA Jr. **Manual de controle higiênico-sanitários em alimentos**. 5. ed. São Paulo: Ed. Varela, 2002. 397 p.

SILVA, T.M. **Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado**. 2008. 104 f. (Dissertação) - mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2008.

SILVEIRA, N. F. D. A. et al. Bactérias Produtoras de Histamina e Potencial para sua Formação em Peixes de Origem Fluvial ou Lacustre. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 19-25, jun. 2017.

SOARES, K. M. P; GONCALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, 2012.

TAKEMOTO, E.; EVANGELISTA, W.P.; MINAZZI-RODRIGUES, R.S.; MARSIGLIA, D.A.P.; OLIVEIRA, C.A.F.; GLÓRIA, M.B.A. Histamine intoxication

outbreak associated to canned tuna intake in the state of São Paulo, Brazil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 11, n. 126, p. 29-32, 2014.

TAO, Z. H.; SATO, M.; YAMAGUCHI, T.; NAKANO, T. Formation and diffusion mechanism of histamine in the muscle of tuna fish. **Food Control**, v. 20, p. 923-926, 2011.

TAVARES, R. D. O. **Avaliação da estabilidade térmica de histamina em conservas de pescado por CLAE**. 52 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012.

TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. Geneva: World Health Organization. p. 47, 1986. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/66407> > acessado em: 11/12/2018

TORIDO, Y.; OHSHIMA, C.; TAKAHASHI, H.; MIYA, S.; IWAKAWA, A.; KIMURA, T. K. B. Distribution of psychrophilic and mesophilic histamine-producing bacteria in retailed fish in Japan, **food control, Food Control**, v.46, p. 338-342, 2014.

VECIANA-Nogués, M. T.; MARINÉ-Font , A.; VIDAL-Carou, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP- related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, n. 45, p.2036-2041, 1997.

ZEFERINO, J. A, SANTOS R. B; TONINI, P. M; DELVINO, F. M; AMARAL D. A. Pesquisa de Coliformes a 45°C, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. Em Sushis comercializados em restaurantes de Belo Horizonte – MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 1, p. 85-90, 2013.

6. REFERÊNCIAS

ABBOTT, S.L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae* In: Murray PR et al. **Manual of clinical microbiology**. 8ª ed. Washington,D.C., ASM Press; p.684- 700, 2003.

ANDRADE, C.D.S. et al. Determinação da microbiota histamina positiva em camarão Histamina. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, n. 67, p. 46-51, 2008.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th.ed. Washington: American Public Health Association, p. 676, 2001.

ARAÚJO, W. M. C. et al. **Alquimia dos alimentos**. Brasília: 3º edição, Editora Senac, Brasília-DF, 2014.

BJORNSDÓTTIR-BUTLER, B. et al. Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. **International Journal of Food Microbiology**, n. 139, p. 161-167, 2010.

BRAGA, L.G.T. et al. Trânsito gastrintestinal de dieta seca em *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 131-134, 2007.

BRASIL. RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Brasília, DF: ANVISA, 2001.

BRASIL. Ministério da saúde. Guia alimentar para a população brasileira. 2º edição. Brasília: Ministério da saúde, p. 156, 2014.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/>> Acessado em 02/06/2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Histórico da pesca de atuns e afins no Brasil**, 2000. Disponível em: <www.mercadodapesca.com.br/cadeias_atuns.php?pag=historia>Acessado em: 25/05/2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de peixe fresco. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 19 maio 1997.

KRIEG, N.R., STALEY, J.T. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, e Ed. Volume 2. New York: Springer Science+Business Media Inc., p.587-607, 2005.

BROOKS, Geo. F. et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G. **Microbiologia para Ciências da Saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 225-230, 1998.

CHANG, S. C.; KUNG, H. F.; CHEN, H. C.; LIN, C. S.; TSAI, Y. H. Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning. *Food Control*, v. 19, p. 16–21, 2008.

CHEN, H. C.; HUANG, Y. R.; HSU, H. H.; LIN, C. S.; CHEN, W. C.; LIN, C. M.; TSAI, Y. H. Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. **Food Control**, v. 21, p. 13–18, 2010.

EVANGELISTA, J. Contaminações em Alimentos. **Alimentos: um Estudo Abrangente**. RJ,SP, BH: Atheneu, c.7, p.175-230, 1994.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Fisheries and Aquaculture Departments – Garantia de qualidade dos produtos da pesca. 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org>. > Acessado em: 20/01/2017.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Fish and fishery products hazards and controls guidance**. 4 ed. Washington: Office of Seafood,. Chap. 7. p.113-152, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S.; OLIVEIRA, C. F. Qualidade do pescado. In GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S (Org). Higiene e vigilância sanitária dos alimentos. 2 ed. São Paulo: Varela, p.125-139, 2003.

GILCHRIST, M.J.R. Enterobacteriaceae: Opportunistic Pathogens and other Genera. In.: MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6 ed. Washington: ASM Press, p.457-464, 1995.

GOMES, M. B. et al. O Risco das Aminas biogênicas nos Alimentos. **Revista Ciência e saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1123-1134, 2014.

HAYES, P. R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, p. 369, 1993.

HERRERO, M. M. H. **Pescado a más consumo más control**. Consumaseguridad (el diario de la seguridad alimentaria), Barcelona, 2001.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9^a ed., Baltimore. p. 787, 1994.

HUSS, H.H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. FAO Documento Técnico sobre as Pescas No. 334. Roma: FAO; 1997. Disponível

em:<<http://www.fao.org/docrep/003/T1768P/T1768P04.htm#ch3.4>> Acessado em: 20/06/2017.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, p.147-150, 2000.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.161-169, 1998.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 347-361.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN,W.C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LEDERER, J. **Enciclopédia moderna de higiene alimentar**. São Paulo: Manole Dois, p. 224, 1991.

LENZA, R.C. **Ocorrência de histamina no pescado**. 59f. Monografia (Curso de pós-graduação "Lato Sensu" em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal)– Universidade Castelo Branco, São Paulo, São Paulo, 2006.

LESSA, R. P. Recursos Pesqueiros da Região Nordeste. In: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Programa REVIZEE: **Avaliação do potencial sustentável**

de recursos vivos na zona econômica exclusiva. Relatório Executivo. Brasília, DF: MMA, Secretaria de Qualidade Ambiental, p.280, 2006.

LU, S. et al. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. **Food Control**, v. 4, n. 21, p. 444-449, 2010.

Mercosul-ABIA (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO) Identidad y calidad de pescado fresco. Mercosur/GMC, Resolución 40/94. In: **Compêndio das Resoluções do Mercosul**. São Paulo, p. 76-78, 1997.

NICKELSON II, R.; MCCARTHY, S.; FINNE, G. **Fish, crustaceans and precooked seafoods.** In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. APHA, 4 ed. Cap. 48, p. 497-505, 2001.

NIVEN, C. F. Jr.; JEFFREY, M. B.; CORLETT, D. A. Jr. Differential plating medium for the quantitative detection of histamine producing bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington. v.45. p.321-322, 1981.

MIMS, C. et al. **Microbiologia médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, p. 253-262, 1999.

NIZIMANI, A.G. et al. Formation of biogenic amines and relation to microbial flora and sensory changes in smoked turkey breast fillets under various

packaging conditions at 4 degrees. **Food Microbiology**, v. 25, n.3, p.509-517, 2008.

NUNES, A.M.N. Qualidade dos pescados – parte II. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 32, p. 5-9, 1994.

O'HARA C. M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and others aerobic gram -negative bacilli. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 147-162, 2005.

OBRINK, K. J. Histamine and gastric acid secretion. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 26, Suppl. 180, p. 4-8, 1991.

OLIVEIRA, J.M. de. O peixe e a saúde: das recomendações para o consumo às possibilidades ambientais de atendê-lo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 20, n. 1(Supl), p. 141-146, 2013. Disponível em: <<https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8634592>>
Acessado em: 20/05/2017.

OLIVEIRA, R.B.A. **Qualidade de atuns tipo exportação capturados pelo espinhel pelágico no litoral de Pernambuco e Rio Grande do Norte, Brasil.** 107 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Ciências Domésticas - Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. 2009.

OLIVEIRA, S.J. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. Ed. da Ulbra: Canoas, RS, p. 142, 1995.

PERALTA, E. M.; JR. A. E. S. Formação de histamina e qualidade microbiológica do peixe leite (*Chanos chanos*) durante o armazenamento ambiental. **Extreme Life, Biospeology & Astrobiology International Journal of the Bioflux Society**, v. 7, n. 1, 2015.

QUINN, P.J. et al. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby, 1994, 648p. Relative amounte of β -lactamase produced by strains. **Scandinavia Journal Infectious Diseases**, v. 25, p. 23-29, 1980.

RAMOS FILHO, M.M. et al. Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28 n. 2, p. 361-365, 2008.

RODRIGUES, K.B. **Histamina x Pescado: revisão bibliográfica**. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário Vila Velha, 2007.

SETHA, B. et al. Inibition of histamina formation on the frigate tuna (***Auxis thazard thazard*, L**) using leaf extract of ***Jatropha curcas***. **International Journal of Advanced Research** , v. 2, n. 1, p. 350-356, 2014.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos**. 3. ed . São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, T.M. **Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado.** 103 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2008.

SILVEIRA, N. F. D. A. et al. Bactérias Produtoras de Histamina e Potencial para sua Formação em Peixes de Origem Fluvial ou Lacustre. **Brazilian Journal of Food Technology**, [S.L], n. 4, p. 19-25, 2017.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos.** Brasília: Embrapa, p. 159, 1995. TAM, L.N. et al. Towards improved quality benchmarking and shelf life evaluation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Food Chemistry**, n. 235, p. 220-226, 2017.

SOUZA, A. L. M. et al. Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura. **Arquivos do Instituto Biológico São Paulo**, v. 82, p. 1-11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000382013>> Acessado em 20/06/2017.

TAKEMOTO, E. et al. Histamine intoxication outbreak associated to canned tuna intake in the state of São Paulo, Brazil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 11, n. 126, p. 29-32, 2014.

TAVARES, R. D. O. **Avaliação da estabilidade térmica de histamina em conservas de pescado por CLAE.** 52 f. Dissertação (mestrado) -

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012.

TORNADIJO, M.E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J.M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, London, v.18, p. 499–509, 2001.

TRABULSI, L.R. ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3^a ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C. Generalidades sobre enterobactérias. In.: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p.207-213. TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, p. 247-249, 1999

TORIDO, Y.; TAKAHASHI, H.; KUDA, T.;KIMURA, B. Analysis of the growth of histamine-producing bacteria and histamine accumulation in fish during storage at low temperatures. **Food Control**, v. 26 p. 174-177, 2012.

VECIANA-Nogués, M. T.; MARINÉ-Font , A.; VIDAL-Carou, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP- related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, London, n. 45, p.2036-2041, 1997.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, p.370, 2004.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Dourado. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, p.257-286, 2005.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; et al. Koneman, **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas colorido. 6^o ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 2008.

Z.H. Tao, M. Sato, Y.L. Han, Z.J. Tan, Y. Yamaguchi, T. Nakano, **Food Control**, v. 21 p. 1154, 2011.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: **Aquicultura: Experiências brasileiras**. C.R. Poli; A.T.B. Poli; E.R.Andreatta e E. Beltrame (organizadores), Florianópolis, Multitarefa Editora Ltda, p. 369-406, 2004.