

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Bactérias produtoras de histamina e
potencial para sua formação em peixes
de origem fluvial ou lacustre**

Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Orientador: Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

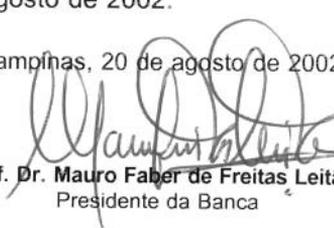
PARECER

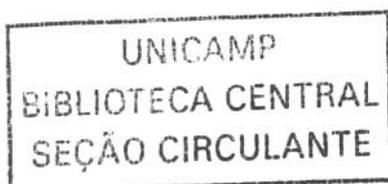
Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
por **Neliane Ferraz de Arruda
Silveira**, aprovada pela
Comissão Julgadora em 20 de
agosto de 2002.

Campinas, SP

2002

Campinas, 20 de agosto de 2002


Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Presidente da Banca



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

IDADE 30
CHAMADA T/UNICAMP
Si396
EX
MBO BCI 50843
OC 16.837102
DX
EÇO R\$ 11,00
TA 12/09/02
CPD

100172906-1

B ID 256576

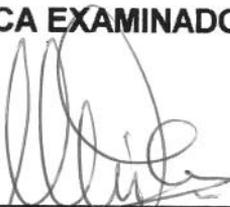
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Si39b Silveira, Neliane Ferraz de Arruda
Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua
formação em peixes de origem fluvial ou lacustre /
Neliane Ferraz de Arruda Silveira. – Campinas, SP: [s.n.],
2002.

Orientador: Mauro Faber de Freitas Leitão
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Bactérias. 2.Histamina. 3.Peixes. 4.*Morganella
morganii*. I.Leitão, Mauro Faber de Freitas.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão
(Orientador)



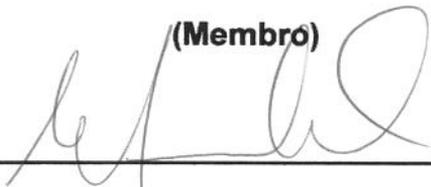
Profa. Dra. Marília Oetterer
(Membro)



Dra. Vera Lúcia Signorelli Baldini
(Membro)



Prof. Dr. Arnaldo Yoshitreru Kuaye
(Membro)



Prof. Dr. Marcelo Cristianini
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Profa. Dra. Marisa A. Rodrigues Pollonio
(Membro)

200243292

DEDICO

Aos meus pais Nélio e Nildes e demais familiares

Ao meu esposo Tadeu

Ao meu filho Matheus

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem tudo devo, fonte de todo bem e toda graça.

Ao Prof. Dr. Mauro Faber Freitas Leitão, pela orientação, compreensão e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro no desenvolvimento experimental desta pesquisa.

Ao ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela dispensa em período parcial para realização do curso de pós graduação e pelo apoio nas viagens para as coletas de amostras.

À empresa CPEI, Central de Produtos Enzimáticos e Imunológicos Ltda., especialmente ao Sr. Josef, pela concessão dos kits rápidos "Histamarine" para análise de histamina nas amostras de extrato de tecido muscular e filés de peixes.

A todos os pesquisadores e funcionários do Instituto de Pesca, núcleos de Pindamonhangaba, São Paulo e Campos do Jordão pela doação dos peixes e auxílio nas coletas.

Ao Dr. Alcides Ribeiro Teixeira Filho, pesquisador científico do Instituto de Pesca pela colaboração nos experimentos e trabalhos executados nessa pesquisa.

Aos estagiários, Maria de Lourdes Fischer Baccin, Cleide Alves do Nascimento, Chen Lie Tse e Valéria Marques Oliveira pelo auxílio nas etapas experimentais deste trabalho.

Aos meus colegas, funcionários do Núcleo de Microbiologia do ITAL, Neusely, Dionir, Valéria, Fernanda, Marta, Rosana, Scheilla, Adelaide, Luciara, Lidiane, Cláudia, Sandra e Margarete, pela compreensão, apoio e amizade dedicados durante a realização deste trabalho.

Ao Centro de Química e Nutrição Aplicada do ITAL, especialmente às pesquisadoras, Vera Lúcia Signorelli Baldini e Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel pela colaboração, amizade e disponibilidade na execução das análises de histamina nas amostras de peixes utilizadas nesta pesquisa.

Aos motoristas do ITAL, especialmente ao Sr. Carlos Roberto Colucci e Sr. José Araujo Vieira, pelo apoio nas coletas das amostras de peixes do presente trabalho.

À Banca examinadora pelo convite aceito na participação da mesma, e pelo tempo dedicado na avaliação deste trabalho.

À senhorita Maria Aparecida Ferreira pelo trabalho realizado em casa, pelo carinho dedicado ao meu filho Matheus.

A todas as pessoas que colaboraram, de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho de tese.

ÍNDICE

RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1. Importância da histamina em alimentos. Origem, toxicologia e fatores que potencializam sua ação.....	8
3.2. Microbiota produtora de histamina em alimentos	15
3.3. Histamina em alimentos.....	19
3.4. Metodologia analítica para histamina.....	22
3.5. Dados epidemiológicos sobre histamina em alimentos	23
3.6. Padrões de histamina para peixes.....	26
3.7. Controle da produção de histamina em peixes.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Material e procedimento de amostragens.....	31
4.2. Procedimento experimental	32
4.2.1. Contagem microbiana total de psicrotróficos, mesófilos e de bactérias presuntivamente histamina-positivas em ágar Níven dasuperfície de peixes	32
4.2.2. Identificação das culturas presuntivamente histamina-positivas e confirmação de capacidade de produção de histamina.....	34
4.2.3. Avaliação presuntiva da produção <i>in vitro</i> de outras aminas biogênicas.....	34
4.2.4. Quantificação de histamina produzida <i>in vitro</i> , por culturas selecionadas...	35
4.2.5. Determinação de histidina livre, aminoácidos totais livres e histamina em tecido muscular de peixes.....	35
4.2.6. Testes de armazenamento de extrato de tecido muscular estéril de curimatá inoculado com <i>Morganella morganii</i>	36
4.2.7. Testes de armazenamento de filés de curimatá inoculados com <i>Morganella morganii</i>	37

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Microbiota superficial das amostras de peixes	38
5.2. Descarboxilação de outras aminas biogenicas <i>in vitro</i>	44
5.3. Avaliação quantitativa da produção de histamina pelas culturas bacterianas selecionadas	46
5.4. Determinação de histidina livre, histamina e aminoácidos livres totais em peixes de origem fluvial ou lacustre	47
5.5. Histamina em extrato muscular de curimatá inoculado com <i>Morganella morganii</i> e correlação com a intensidade de contaminação	51
5.6. Histamina em filés de curimatá em condições naturais, inoculados com <i>Morganella morganii</i> e correlação com as contagens microbianas	53
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Conteúdo de histamina em postas de pescado antes e após cocção.....	10
TABELA 2. Microbiota deterioradora (em %) em filés de salmão durante estocagem a 10°C (CRAPO & HIMELBLOOM, 1999)	18
TABELA 3. Conteúdo de histamina em diferentes tipos de pescado (TAYLOR et al., 1978)	20
TABELA 4. Microbiota mesófila (35°C) e psicotrófica (20°C) em superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre.	39
TABELA 5. Culturas presuntivamente histamina-positivas isoladas da superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre.....	40
TABELA 6. Bactérias produtoras de histamina isoladas da superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre, confirmadas segundo testes descritos por YOSHINAGA & FRANK (1982).	43
TABELA 7. Descaboxilação de alguns aminoácidos por bactérias isoladas de peixes de origem fluvial ou lacustre, sob diferentes condições de incubação	45
TABELA 8. Avaliação quantitativa da produção de histamina (mg/100g) por bactérias inoculadas em caldo de Niven (NIVEN, JEFREY & CORLETT, 1981) sob diferentes condições de incubação*	46
TABELA 9. Produção de histamina em extrato muscular estéril de curimatá inoculado com <i>Morganella morganii</i>	52
TABELA 10. Produção de histamina em filés de curimatá, em condições naturais, inoculado com <i>Morganella morganii</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Formação de histamina nos alimentos (HUSS, 1993).....	9
FIGURA 2. Mecanismo do processo de intoxicação por histamina (SATTLER, 1986).....	12
FIGURA 3. Tanque de criação de trutas da Estação Experimental do Instituto de Pesca de Campos do Jordão-S.Paulo	32
FIGURA 4. Amostragem dos peixes pela técnica de esfregaço.	33
FIGURA 5. Teores de histamina, histidina e aminoácidos livres totais em amostras de peixes capturados em criadouros do Estado de São Paulo.....	48
FIGURA 6. Níveis potenciais de histamina passíveis de formação em espécies de peixes de origem fluvial ou lacustre	50

RESUMO

Nesta pesquisa foram realizadas avaliações quantitativas e qualitativas da microbiota bacteriana histamina-positiva, presente na superfície de espécies de peixes fluviais ou lacustres, a saber: truta (*Oncorhynchus myrkis*), carpa (*Cyprinus carpio*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), coletadas em quatro épocas do ano, em três estações experimentais do Estado de São Paulo: Campos do Jordão, São Paulo e Pindamonhangaba, respectivamente. As amostras em questão foram analisadas em relação à contagem da microbiota total e produtora de histamina, identificando-se as culturas presuntivamente positivas e testando-se a capacidade de formação de histamina *in vitro*, em meio de NIVEN, JEFFREY & CORLETT (1981). Também foi avaliada a capacidade de produção de outras aminas biogênicas, utilizando-se o meio proposto por YAMANII & UNTERMANN (1985).

Foram determinados os níveis de histidina livre e histamina originalmente presentes nas espécies de peixe acima descritas, acrescidas de amostras de curimatá (*Prochilodus scrofa*). Estudou-se, a influência da temperatura de armazenamento na capacidade de produção de histamina em extrato estéril de tecido muscular de curimatá, bem como em filés dessa espécie, mantidos em diferentes condições de temperatura, ambos inoculados com cultura pura de *Morganella morganii*.

Os resultados obtidos revelaram a existência de microbiota histamina-positiva com predominância de microrganismos psicrotóxicos, nas amostras coletadas nos meses de inverno, em Campos de Jordão e de mesófilos em todas as demais épocas e regiões. Na microbiota presuntivamente histamina positiva, foram caracterizadas bactérias das famílias *Vibrionaceae* (48,7%), *Pseudomonadaceae* (22,4%), e *Enterobacteriaceae* (16,3%). Um número reduzido de bactérias histamina positivas foi isolado, confirmando-se apenas 17 entre as 49 culturas presuntivamente positivas inicialmente isoladas. *Morganella morganii*, da família *Enterobacteriaceae*, foi a única espécie comum em todas as amostras de peixes analisadas, e, entre as culturas selecionadas para testes adicionais, foi

a que demonstrou o maior potencial de descarboxilação dos aminoácidos estudados, bem como de produzir histamina em níveis considerados tóxicos (>100mg/100ml ou g) em meio líquido de Níven a 30°C/1 dia e a 15°C/3 dias.

Nos estudos para determinação dos teores de histamina e histidina livre nas espécies de peixes analisadas, não foi detectada a presença de histamina. No entanto, em relação aos teores de histidina livre, o curimatá e a carpa apresentaram valores elevados, de 273,78 mg/100g e 129,24 mg/100g, respectivamente, o que confere a estas espécies um maior risco de se tornarem veículos de intoxicação histaminica.

A temperatura de incubação das amostras exerceu uma notável influência na capacidade de produção de histamina, tanto em extrato muscular como em filés de curimatá inoculados experimentalmente com *Morganella morganii*. A este respeito, constatou-se máxima produção a temperatura de 15°C, alcançando, após 3 dias de incubação, valores de 107,78 mg/100g em extrato muscular e de 119,39 mg/100g, após 6 dias, em filés.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que, a exemplo do pescado de origem marinha, *Morganella morganii* foi o principal microrganismo isolado da superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre como evidencia máxima para produção potencial de histamina e de outras amins biogênicas. Ficou evidenciado que a temperatura de 15°C foi a que se mostrou mais adequada para a produção de histamina em níveis considerados tóxicos, confirmando, assim, que temperatura de abuso é condição essencial para que os peixes cultivados ou provenientes de pesqueiro se transformem em veículos de intoxicação histamínica. Por outro lado, evidenciou-se que temperaturas de refrigeração, no caso, 5°C são, provavelmente, as principais barreiras para impedir a produção de histamina em níveis potencialmente tóxicos, durante o armazenamento desses peixes sob refrigeração.

SUMMARY

Histamine producing bacteria and potential for its formation in fresh river fishes

In this research, it was evaluated the total and histamine producing microflora isolated from the surface of freshwater fish species; trout (*Oncorhynchus myrkis*), "tilapia" (*Oreochromis niloticus*), and carp (*Cyprinus carpio*), collected in four seasons of the year, in three experimental growing stations, located in São Paulo State, Brazil: Campos de Jordão, São Paulo and Pindamonhangaba respectively. The samples were analyzed for total microbial count and histamine producing bacteria in NIVEN, JEFFREY & CORLETT medium (1981). The capacity of production of other biogenic amines *in vitro* was also tested in YAMANII & UNTERMANN (1985) medium. It was also evaluated the level of free histidine, histamine and potential histamine in the fishes samples analyzed for microflora and in "curimatá" (*Prochilodus scrofa*). It was also evaluated the influence of the storage temperature in the capacity of histamine production in sterile muscular tissue extract of "curimatá" and in the fillets of the same species in natural conditions, both inoculated with pure culture of *Morganella morganii*. The histamine determination was done after 1,3, and 6 days of storage at temperatures of 5°C, 15°C and 30°C. The results showed a predominance of psychrotrophic microorganisms in winter time, Campos do Jordão, and a predominance of mesophilic bacteria in all the other regions. Among presumptive histamine positive isolates it was characterized: *Vibrionaceae* (48,7%), *Pseudomonadaceae* (22,4%) and *Enterobacteriaceae* (16,3%) bacterial families. Histamine producing bacteria were found in low numbers, with only 17 isolates from a total of 49 presumptive histamine positive colonies being confirmed as histamine producers. *Morganella morganii* (*Enterobacteriaceae*), was the only culture found in all analysed fish species and among the selected isolates for additional tests, was the one that showed the highest potential for amino acid decarboxylation as well as for

histamine production in toxic levels (>100 mg/100 g or ml) in NIVEN, JEFFREY & CORLETT broth (1981), at $30^{\circ}\text{C}/1\text{day}$ and at $15^{\circ}\text{C}/3$ days.

It was not detected the presence of histamine in all analysed samples of freshwater fishes; however concerning the free histidine levels, "curimbatá" and carp showed high values of 273.78 mg/100g, and 129.24 g/100g respectively, thus these fish species are considered of potential risk as histamine intoxication vehicles.

The storage temperature influenced markedly the capacity of histamine production in muscular tissue extract, as well as in "curimbatá" fillets. Concerning to this, it was observed that at 15°C the highest histamine levels were produced after 3 days of storage, values of 107.78 mg/100g in muscular tissue extract and 119.39 mg/100g being reached after 6 days in the fillets.

The results showed that, like in marine fisheries, *Morganella morganii* was the main microorganism found in the freshwater fish microflora that showed the highest potential for histamine production, as well as, to form other biogenic amines. It was also confirmed that the temperature of 15°C was the most adequate for histamine production in toxic levels. This data confirmed that the abuse temperature is a essential condition for this kind of fish be a histamine intoxication vehicle. It was also confirmed that low temperatures, equal to or less than 5°C , are the main barriers to avoid the histamine production in freshwater fish species during storage.

1. INTRODUÇÃO

A presença de histamina e outras aminas biogênicas em alimentos tem sido relatada como responsável por processos de intoxicação, de gravidade variável e afetando, principalmente, indivíduos evidenciando maior susceptibilidade.

O processo patológico caracteriza-se por um período de incubação curto (minutos a poucas horas), com um período de duração também reduzido a algumas horas. Os sintomas mais frequentes são os cutâneos (edema facial, urticária), afetando também o trato intestinal (náuseas, vômitos, diarreia) bem como um eventual comprometimento neurológico (cefaléia, sensação de queimadura na boca).

O mecanismo do processo patológico da histamina, leva a crer que existam potencializadores dessa amina, quando consumida no alimento alterado, uma vez que estudos revelaram que a administração oral de histamina não tem os mesmos efeitos observados quando a amina é ingerida no alimento contaminado (TAYLOR, 1990).

A presença de histamina tem sido detectada em diferentes tipos de alimentos, principalmente pescado.

Em razão da comprovada patogenicidade, a legislação de diferentes países é restritiva com relação à presença de histamina nos alimentos industrializados; há evidências, de que quando o alimento contém mais de 100mg/100g, de histamina, o risco de intoxicação é elevado (IENISTEA, 1973).

A produção de histamina no alimento é devida principalmente a um processo de descarboxilação do aminoácido histidina presente na forma livre, levando à formação de histamina, pela atividade da enzima histidina descarboxilase. No entanto, é fundamental destacar que o processo de descarboxilação da histidina se deve à atividade microbiana nos alimentos, uma vez que esta enzima não está presente naturalmente nos tecidos dos mesmos. Assim, a presença de histamina em altas concentrações está associada ao grau de contaminação bacteriana dos alimentos e sua quantidade pode indicar o grau

de deterioração desses produtos. Esse índice tem sido bastante útil como indicador do nível de qualidade de alimentos, especialmente em produtos de pescado (FÉBRORT, SKOUPA & PEC 2000; BOVER-CID, IZQUIERDO-PULIDO & VIDAL-CAROU, 2001).

A maioria dos estudos referentes à ocorrência de histamina em pescado se restringe a espécies do ambiente marinho, principalmente de regiões temperadas ou de clima frio. Em relação aos peixes de origem fluvial ou lacustre, os dados da literatura são ainda muito escassos. No Brasil, a atividade de aquicultura vem gradativamente ocupando uma posição de destaque no aspecto econômico, representando uma alternativa significativa para a captura e industrialização do pescado de origem marinha. As condições climáticas prevalentes em algumas regiões são ideais para a atividade de criação de espécies como a tilápia, truta, curimatá, entre outros. Muitas dessas espécies já são produzidas em quantidades elevadas, que justificam plenamente estudos tecnológicos que visem otimizar o aproveitamento industrial das mesmas, como alternativa à comercialização predominante do pescado “in natura” ou refrigerado e congelado. É evidente que a maior disponibilidade de matéria-prima e a sua industrialização por diversos processos exigem a realização de estudos paralelos, procurando avaliar riscos eventuais à saúde pública decorrentes destas atividades.

Além disso, as atividades recreativas, envolvendo peixes de água doce, como os “pesque-e-pague”, vêm sendo implantadas em vários estados do país, demonstrando ser uma alternativa produtiva, competitiva e lucrativa na exploração industrial do pescado (BRANDÃO, 1996).

Nesse contexto, são relevantes pesquisas que forneçam informações tecnológicas e/ou que abordem aspectos de saúde pública, como por exemplo, os riscos da presença de histamina em peixes explorados comercialmente, principalmente quando se consideram as notórias deficiências da cadeia de refrigeração de alimentos que prevalecem na maioria das regiões do país.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- 2.1. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota bacteriana histamina positiva, presente na superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre de importância comercial;
- 2.2. Avaliação dos teores de histidina livre e de histamina nas principais espécies de peixes, de origem fluvial ou lacustre, recomendadas para programas de aquicultura;
- 2.3. Estudo da influência do binômio tempo/temperatura de armazenamento dos peixes com teores elevados de histidina livre, na intensidade de produção de histamina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Importância da histamina em alimentos.

Origem, toxicologia e fatores que potencializam sua ação

Aminas biogênicas, em geral, são definidas como bases orgânicas, não-voláteis, de baixo peso molecular, alifáticas e alicíclicas. Surgem no processo metabólico de animais, plantas e microrganismos (LUTEN et al. 1992). Elas se formam em alimentos pela descarboxilação de aminoácidos livres, aminação de aldeídos, decomposição de fosfolípidos ou desnaturação de aminoácidos por processo térmico (MAGA, 1978). No entanto, a principal via de formação em alimentos é a de descarboxilação de aminoácidos precursores livres por enzimas microbianas, não presentes naturalmente nos tecidos (LEITÃO, 1988, LUTEN et al., 1992, HUSS, 1993).

HALÁSZ et al. (1994) e BOVER-CID, IZQUIERDO-PULIDO & VIDAL-CAROU (2001) relatam que há uma relação, diretamente proporcional entre carga microbiana e formação de aminas biogênicas em alimentos, concluindo que a presença dessas aminas pode ser um indicador da qualidade higiênico-sanitária, especialmente em peixes e derivados. Dessa maneira, além das implicações toxicológicas, alguns autores apontam a presença destas aminas como indicadores de contaminação e de práticas deficientes na cadeia produtiva de alimentos (BALDINI, 1982, BOVER-CID, IZQUIERDO-PULIDO & VIDAL-CAROU, 2001, NANDON, ISMOND & HOLLEY, 2001).

As aminas biogênicas presentes nos alimentos normalmente são degradadas pelo organismo humano, através das enzimas conhecidas como amino-oxidases, presentes no trato gastrointestinal (SMITH, 1981). Problemas de intoxicação ou acúmulo no organismo podem, no entanto, ocorrer se a ingestão for elevada ou o catabolismo destas aminas for inibido por algum mecanismo (TAYLOR, 1990, HALÁSZ et al., 1994, BRANDÃO, 1996).

Segundo BARDOCZ et al. (1993), alguns estudos têm indicado que o acúmulo prolongado de aminas no organismo tem um efeito nocivo, uma vez que

pode potencializar um crescimento celular desordenado, sugerindo que essas substâncias possam favorecer o câncer. HALÁSZ et al. (1994) e OLIVEIRA et al. (1995), relatam que algumas aminas biogênicas como a putrescina e a cadaverina também podem reagir com alguns conservadores dos alimentos como o nitrito, e formar nitrosaminas, substâncias consideradas potencialmente cancerígenas, mutagênicas, teratogênicas e embriopáticas.

A intoxicação mais comum por aminas biogênicas em alimentos envolve a histamina. Esta é uma amina primária, 4 (2-amino-etil) imidiazol, que se origina da descarboxilação do amino-ácido L-histidina presente na forma livre, quando, pela atividade da enzima histidina descarboxilase, ocorre a seguinte reação:

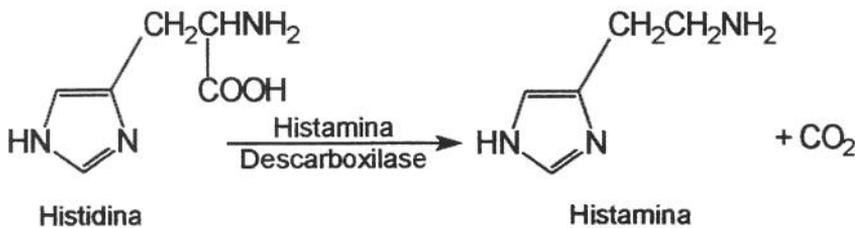


FIGURA 1. Formação de histamina nos alimentos (HUSS, 1993)

A histamina endógena tem uma função importante em processos biológicos no organismo humano, incluindo vaso-dilatação, secreção gástrica, entre outros. Quando ocorre a absorção de maneira exógena, isto é, através do consumo de alimentos contendo doses elevadas, a amina entra na corrente sangüínea e pode causar a intoxicação (TAYLOR, LIEBER & LEATHERWOOD, 1978).

A intoxicação alimentar por histamina é conhecida como a “intoxicação por escombrídeos” (scombroid food poisoning), devido à sua associação ao consumo de peixes da família *Scombridae*, contendo grandes quantidades do aminoácido histidina livre no músculo (BALDINI, 1982). Essas espécies incluem peixes pelágicos (vivem na superfície ou próximos a ela), particularmente do filo *Chordata*, classe *Osteichthyes*, família *Scombridae*, que inclui o atum (*Thunus thunus*), o bonito (*Sarda sarda*), e cavalinha (*Scomber japonicus*), que quando alterados microbiologicamente, podem conter níveis elevados de histamina, provocando quadros graves de intoxicação, principalmente em indivíduos mais

sensíveis (TAYLOR et al., 1978). Atualmente, sabe-se que outros alimentos, incluindo os peixes não-escombrídeos, embutidos cárneos, queijos maturados, bebidas fermentadas também podem apresentar histamina e ser potencialmente tóxicos.

De acordo com TAYLOR, LIEBER & LEATHERWOOD (1978), peixes contendo níveis significantes de histamina nem sempre evidenciam sinais aparentes de deterioração, aumentando assim a probabilidade de que produtos aparentemente inalterados, porém potencialmente tóxicos, possam estar sendo oferecidos ao consumidor. A histamina revela elevada resistência térmica, não sendo destruída após tratamentos térmicos normalmente aplicados aos alimentos, sendo parcialmente destruída em 3 horas a 110°C ou 90 minutos a 116°C (IENISTEA, 1973).

BARANOWSKI et al. (1990) conduziram um estudo para determinar se durante a operação de cocção, poderia haver perda do conteúdo de histamina no alimento, utilizando para isso, postas de pescado marinho frescas, “mahimahi” (*Coryphaena hippurus*) com altos teores de histamina. A **Tabela 1** mostra os resultados obtidos nesse experimento, sendo que os métodos de cocção utilizados (forno e vapor), não mostraram ter efeito na redução do conteúdo de histamina nas postas de pescado analisadas. Os binômios temperatura/tempo utilizados nos processos de cocção foram de 180°C/40 minutos, para o forno e 95°C/45 minutos para o vapor.

TABELA 1. Conteúdo de histamina em postas de pescado antes e após cocção.

Postas de pescado	Teores de Histamina (mg/100g)		
	Amostra crua	Após cocção em forno	Após cocção em vapor
1	363	397	374
2	343	356	303

Fonte: BARANOWSKI et al., 1990.

Assim sendo, uma vez produzida no alimento dificilmente será eliminada pelo processo tecnológico aplicado (LORCA et al. 2001). A enzima histidina-decarboxilase formada pode continuar ativa no substrato, independentemente do fato da bactéria produtora não estar mais se multiplicando, possibilitando assim, o acúmulo de histamina em alimentos refrigerados (ICMSF, 1996). O congelamento por longos períodos de tempo pode, no entanto, inativar a enzima, cessando, assim, a produção de histamina no alimento (ICMSF, 1996).

Normalmente, o organismo humano, através das enzimas do trato gastrointestinal (diamino oxidase-DAO e histamina U-metil transferase-HMT) é capaz de catabolizar a histamina e outras aminas biogênicas, sendo esse um processo normal de metabolismo de forma que elas não representam risco para a saúde do consumidor sadio (SMITH,1981). No entanto, se forem ingeridas em quantidades elevadas, ou quando a atividade das enzimas catabolisadoras for inibida por fatores genéticos, substâncias potencializadoras, consumo de álcool, doenças gastrointestinais, entre outros, o catabolismo dessas aminas poderá ser inibido, e os indivíduos mais sensíveis poderão apresentar sintomas de intoxicação (SATTLER, 1986).

O mecanismo exato da intoxicação era virtualmente desconhecido até a década de 80, quando SATTLER (1986), analisou o efeito de diferentes fatores que potencializam a toxicidade da histamina, principalmente pela inativação da diamino-oxidase-DAO e histamina U-metil trasferase, enzimas que atuam na metabolização da histamina ingerida. O esquema da **Figura 2** resume esta proposição. O processo patológico da intoxicação histamínica caracteriza-se por um período curto de incubação (minutos a poucas horas) e também por um período curto de duração (algumas horas).

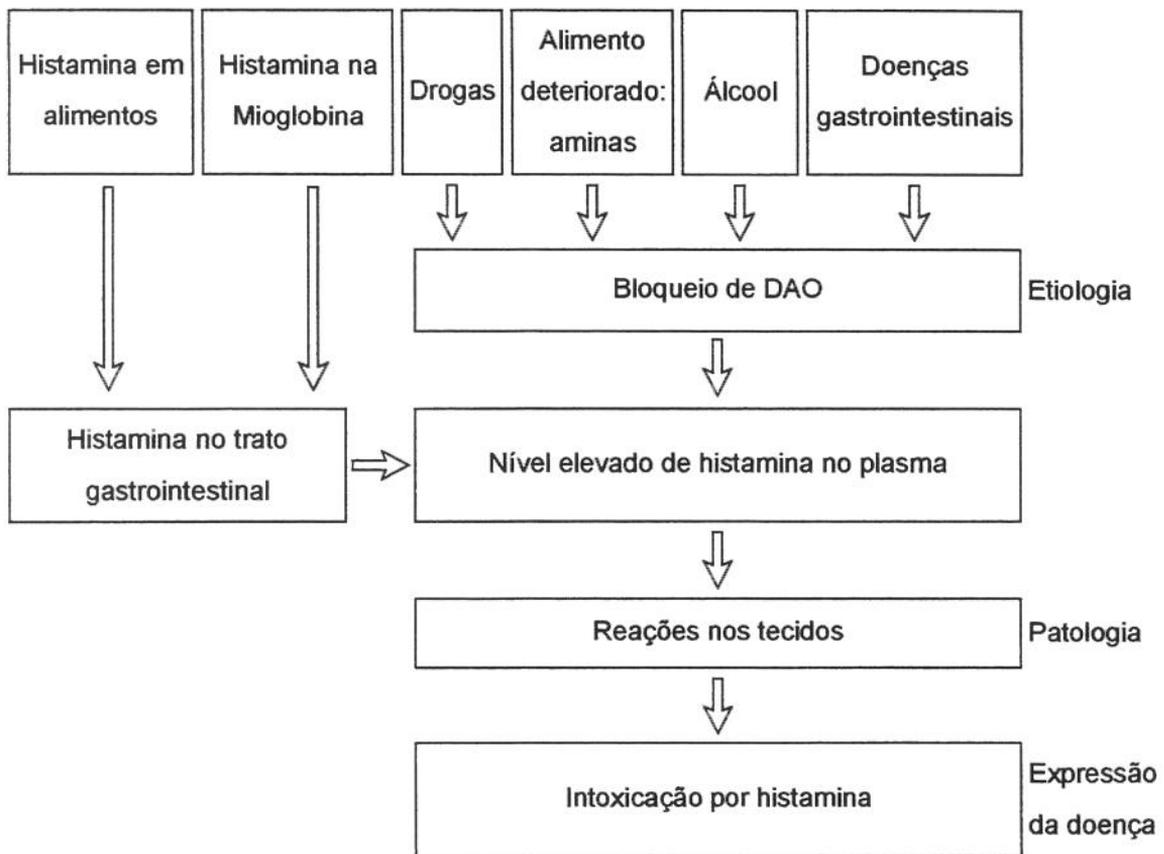


FIGURA 2. Mecanismo do processo de intoxicação por histamina (SATTLER, 1986).

Os sintomas mais freqüentemente observados em uma intoxicação histamínica são os cardiovasculares, que incluem urticárias, hipotensão, cefaléias; os gastrointestinais, que incluem dores abdominais, diarreia, vômito e os de origem neurológica, com dores e inchaços relacionados com as urticárias. No entanto, os mais comuns são os de origem cardio-vascular, principalmente urticárias, eritemas na face e região do pescoço, disfagia, podendo ocorrer choque anafilático. (HUSS, 1993; ICMSF, 1996; ABABOUC, 1991; HARVIMA, TUOMISTO & HUSMAN, 1999; LÉHANE & OLLEY, 2000).

ARNOLD & BROWN (1978) relatam que os sintomas de origem gastrointestinal como náusea e diarreia, também podem ocorrer, porém, normalmente, são evidenciados em menos de 25% das pessoas envolvidas.

Outros sintomas já relatados e atribuídos à intoxicação histamínica são tontura, ansiedade e perda temporária da visão associada à taquicardia (CLARK, 1997; LÉHANE & OLLEY, 2000). Embora sejam raras as complicações mais sérias, existem relatos nos quais problemas de ordem cardíaca e respiratória foram observados em pessoas que já possuíam esses históricos (ASCIONE et al., 1997).

IENISTEA (1973) estudando níveis de tolerância humana à histamina presente em alimentos relatou que em um indivíduo de 70 kg este limite seria de 5 a 6 mg/100g; a ingestão de 8 a 40 mg/100g., causaria uma intoxicação suave, e doses entre 70 e 100mg, provocariam alterações mais graves. Com base nesses níveis de tolerância, o citado autor considerou tóxicos os alimentos contendo teores de histamina entre 10 e 100 mg/100g, e como altamente tóxicos aqueles com mais de 100mg de histamina/100g.

Em relação à taxa de mortalidade por intoxicação histamínica, sabe-se que normalmente ela é muito baixa, embora o desconforto provocado pela intoxicação seja bastante elevado, com a atenuante de que os sintomas tendem a desaparecer após a administração de anti-histamínicos (LÉHANE & OLLEY, 2000).

Em estudos conduzidos por TAYLOR (1990) e CLIFFORD et al. (1989) com voluntários humanos, comprovou-se que a histamina, administrada isoladamente, foi menos tóxica do que igual quantidade desta ingerida em peixes deteriorados, que apresentavam outras substâncias consideradas tóxicas. O paradoxo entre a aparente toxicidade dessa amina, quando consumida em peixes deteriorados e a falta desse efeito, quando consumida pura, pode ser explicado pela presença de potencializadores da histamina, entre eles algumas toxinas e outras aminas biogênicas, como a putrescina e a cadaverina (ARNOLD & BROWN, 1978).

Vários autores propuseram hipóteses evidenciando a potencialização da ação da histamina por outras substâncias químicas presentes em peixes contaminados, embora nenhuma ainda esteja cientificamente comprovada. (LÉHANE & OLLEY, 2000)

A idéia dos potencializadores da toxicidade da histamina, já vem sendo discutida desde meados de 1954, quando dois pesquisadores japoneses, Miyaki & Hayashi, citados por TAYLOR (1995) descobriram que a substância "saurina", tóxica com efeitos similares ao da histamina atuava sinergisticamente, com esta em processos de intoxicação por escombrídeos (TAYLOR, 1985). Pesquisas posteriores, na década de 70, revelaram que a saurina era idêntica à histamina (FOO, 1976).

PARROT & NICOT (1966) sugeriram que outras aminas biogênicas presentes em teores mais elevados em peixes contaminados poderiam interferir com a ação protetora da mucina intestinal. A mucina é uma proteína na forma de uma película que protege o trato gastrointestinal humano e é conhecida como inativadora da histamina exógena (CHU & BJELDANES, 1981). Quando a histamina ingerida se liga à mucina, normalmente é absorvida para ser catabolisada (eliminada) pelo organismo. Se outras aminas interferirem, ligando-se nos sítios nos quais a histamina se ligaria, essa desativação não será então realizada o processo de intoxicação se instala no organismo. CLIFFORD et al. (1989) citam a hipótese da possibilidade de pelo menos parcialmente, outras aminas biogênicas, como a cadaverina e putrescina, por si só se comportarem de maneira idêntica à histamina, aumentando a quantidade de aminas no organismo e conseqüentemente a gravidade dos sintomas de uma intoxicação.

TAYLOR (1986) e STRATON, HUKINS & TAYLOR (1991), relataram uma outra hipótese, a da possibilidade da liberação da histamina endógena que se encontra no interior de mastocitos do organismo humano. Segundo esses autores, outras aminas biogênicas ou mesmo outros compostos como o ácido urocânico, presentes no peixe em decomposição, desgranulariam essas células, liberando a histamina do seu interior, aumentando o conteúdo total dessa amina de forma livre no organismo humano, o que provocaria uma intoxicação.

Muitos outros estudos estão sendo conduzidos, sem haver ainda um resultado conclusivo a respeito de qual hipótese sobre potencializadores do efeito tóxico da histamina seria a exata. No entanto, a simples proposição de todas

essas hipóteses permite concluir que, embora ainda não se tenha esclarecido definitivamente o mecanismo da potencialização do efeito tóxico da histamina, ele parece efetivamente existir (LÉHANE & OLLEY 2000). De acordo com alguns autores, é importante ressaltar o fato de que outras aminas biogênicas ocorrem em quantidades apreciáveis em peixes que contêm altos teores de histamina e em níveis muito baixos em peixes frescos, que não oferecem riscos de intoxicação (MIETZ & KARMAS, 1977; ARNOLD & BROWN, 1978; LÉHANE & OLLEY, 2000).

Apesar da provável existência dos potencializadores da toxicidade da histamina, a evidência definitiva de que ela é o principal agente tóxico envolvido na intoxicação histamínica é incontestável e pode ser comprovada pelos teores elevados da amina presentes na urina dos indivíduos que apresentam sintomas característicos, além da comprovada eficácia de uma terapia pela administração de anti-histamínicos (TAYLOR, 1986; LÉHANE e OLLEY, 2000).

3.2. Microbiota produtora de histamina em alimentos

O pescado apresenta uma microbiota natural, localizada no muco superficial, nas guelras e no trato intestinal; no entanto, sabe-se que a microbiota de importância no processo de descarboxilação da histidina livre presente nos peixes está principalmente concentrada na superfície, podendo ser bastante influenciada pelo ambiente aquático em que o animal vive (BERAQUET & LINDO, 1995 e LEITÃO, 1998). LORCA et al. (2001) relataram que, embora as bactérias produtoras dessa amina possam ser encontradas tanto na superfície dos peixes como nas vísceras, há evidências de que a maioria delas é isolada da camada superficial. Segundo esses autores, a maioria dessas bactérias é de origem entérica e, estando presente no ambiente aquático, especialmente em águas mais contaminadas, podem aderir com facilidade à superfície dos peixes, aumentando a microbiota superficial. LEITÃO et al. (1983), estudando bactérias produtoras de histamina em pescado de origem marinha, constataram a presença dessas bactérias principalmente na superfície (52,6% dos isolamentos), sendo que nas vísceras obtiveram 33,0% de isolamentos.

No momento da captura do peixe, fontes adicionais de contaminação também podem contribuir para modificar a microbiota inicial, como o gelo originado de água de má qualidade, o manuseio inadequado, além das condições de armazenamento pós captura. Com a morte do peixe, as suas defesas naturais deixam de atuar e essa microbiota superficial começa a invadir o interior dos tecidos, acelerando o processo de deterioração.(BERAQUET & LINDO, 1995; LEITÃO, 1988).

De acordo com LEITÃO, BALDINI & SALES (1983), o crescimento bacteriano no pescado após captura e ao longo do armazenamento é, indubitavelmente o principal fator responsável pela sua deterioração. Segundo LISTON (1990), as condições prevalentes de armazenamento, as alterações organolépticas e químicas do peixe, frutos da atividade microbiana levam à rejeição do mesmo, e estas alterações ocorrem principalmente devido ao ataque microbiano às substâncias nitrogenadas não protéicas presentes no tegumento e muco superficial do peixe. Entre essas substâncias estão os aminoácidos livres como a histidina, precursora da histamina, a ribose, creatina e uréia.

KIMATA (1961) e YOSHINAGA & FRANK (1982) estimam que as bactérias formadoras de histamina representem 1% da microbiota superficial do peixe fresco, e sugerem que, com o armazenamento inadequado em temperaturas de abuso, essas bactérias se multiplicam rapidamente, invadem o músculo e atacam a histidina livre, convertendo-a em histamina.

TAYLOR (1990) relata que a enzima histidina descarboxilase não está presente em todas as espécies bacterianas conhecidas e sim em certas espécies da família *Enterobacteriaceae* e nos generos *Clostridium* e *Lactobacillus*. Afirma ainda que mesmo dentro desses grupos, pode haver diferenças individuais entre as espécies. O método para se detectar se uma espécie é produtora de histamina seria pela medição da capacidade de descarboxilação da amina presente no substrato a ser testado. De acordo com TAYLOR (1990) e LORCA et al. (2001), a família *Enterobacteriaceae* (principalmente a espécie *Morganella morganii*) é a mais relevante quanto à produção de histamina em peixes.

Pesquisas conduzidas em diferentes países tem confirmado que bactérias da família *Enterobacteriaceae* são as mais ativas em relação á capacidade de produção de histamina em alimentos, destacando-se como principal espécie a *Morganella morganii*, seguida de espécies dos generos *Klebsiella*, *Hafnia*, *Escherichia* (ARNOLD & BROWN, 1978; CATTANEO & CANTONI, 1978; LEITÃO et al., 1983; LORCA et al., 2001).

EITENMILLER et al. (1981) investigando a produção de histamina por *Morganella morganii* (então *Proteus morganii*), constataram que em 22 linhagens estudadas, todas possuíam essa capacidade, porém em diferentes níveis, sendo que algumas produziam mais histamina que outras. LEUNG(1987) postulou sobre a possibilidade da capacidade de produção de histamina por uma bactéria ser controlada por plasmídeo, e assim este pode ser transferido entre linhagens, espécies e gêneros.

De acordo com TAYLOR (1986), ABBABOUC (1991) e KIM, NA & PRICE (1999) *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei* são as bactérias mais comumente responsabilizadas por surtos de intoxicação histamínica. FLETCHER, BREMER & OSBORNE (1999), estudando bactérias produtoras de histamina em pescado defumado, constataram que *Hafnia alvei* foi a espécie que produziu níveis mais elevados de histamina em salmão defumado a quente (1659,4 mg/kg). Também constataram que *Morganella morganii* foi a bactéria isolada com maior frequência nesse tipo de pescado, estando presente em todas as amostras analisadas. Segundo MAVROMATIS & QUANTICK (2002), *Morganella morganii*, continua sendo o microrganismo mais incriminado em surtos de intoxicação histamínica, uma vez que é a bactéria que mais produz essa amina em níveis considerados suficientes para a manifestação de sintomas clínicos característicos de uma intoxicação dessa natureza no homem.

CRAPO & HIMELBLOOM (1999), estudaram a presença de bactérias deteriorantes histamina positivas em filés de salmão armazenados a 10°C, durante 14 dias, e obtiveram os resultados apresentados na **Tabela 2**.

TABELA 2. Microbiota deterioradora (em %) em filés de salmão durante estocagem a 10°C (CRAPO & HIMELBLOOM, 1999)

Gênero	Tempo de Incubação		
	2 dias	7 dias	14 dias
<i>Acinetobacter</i>	5	0	0
<i>Corynebacterium</i>	40	40	10
<i>Flavobacterium</i>	5	5	0
<i>Kurthia</i>	0	40	0
<i>Moraxella</i>	35	5	15
<i>Providencia</i>	0	0	50
<i>Pseudomonas</i>	5	5	25
Bastonetes Gram positivos não identificados	10	5	0
População Total	2.7×10^4	2.0×10^7	3.6×10^8

Segundo esses autores não foram evidenciadas quantidades elevadas de histamina durante a estocagem o que pode ter sido influenciado pela temperatura, considerada abaixo da ideal para que a produção de histamina ocorresse.

De acordo com LEUSCHNER & HAMMES (1998), bactérias lácticas utilizadas como “starter” em processos de produção de queijos também podem ser responsáveis pela produção de histamina, particularmente nos tipos que sofrem maturação prolongada. Em carnes fermentadas também pode ocorrer o aumento de aminas biogênicas pela atividade de culturas “starters”. Porém, nesse caso específico de produtos fermentados, fica difícil determinar a origem da produção de amina, se proveniente da cultura fermentadora desejável ou de uma microbiota contaminante, uma vez que ambas podem evidenciar esse potencial (BOVERCID, IZQUIERDO-PULIDO & VIDAL-CAROU, 2001).

De acordo com TAYLOR & SUMNER (1986), muitas bactérias da família *Enterobacteriaceae* também possuem enzimas para descarboxilar outros aminoácidos livres, precursores de aminas biogênicas conhecidas como possíveis potencializadoras da histamina, como a putrescina e cadaverina. LEUNG (1987), em um trabalho de pesquisa realizado na Austrália, sobre bactérias produtoras de histamina, e que das 36 culturas que isolou de peixes de origem marinha, nenhuma evidenciou capacidade de descarboxilar a lisina e a ornitina, aminoácidos precursores das aminas biogênicas cadaverina e putrescina respectivamente.

Quanto à microbiota produtora de histamina, é importante mencionar ainda que, estatísticas mais recentes, nos países do Reino Unido, indicam que, atualmente mais de 69% dos casos de intoxicação histamínica, devido ao consumo de peixes, registrados naqueles países, já vem sendo confirmados com o auxílio de métodos microbiológicos, como o da determinação de bactérias formadoras de histamina, com a utilização de meios específicos, como o ágar Níven, o mais empregado para esse propósito. (MAVROMATICKS & QUANTICK, 2002).

3.3. Histamina em alimentos

De acordo com IENISTEA (1973), pequenas quantidades de histamina podem ocorrer normalmente em alguns alimentos como o atum, que contém aproximadamente 2mg/100g de histamina na superfície e 1,0-4,0mg/100g no tecido muscular. LEUSCHNER et al. (1998) relatam que em leite e derivados é normal a existência de quantidades de histamina variando de 1mg/kg até 1g/kg. Essas quantidades, no entanto, normalmente não apresentam riscos à saúde humana.

TAYLOR, LIEBER & LEATHERWOOD (1978), analisando diferentes tipos de pescado de origem marinha nas formas fresca, congelada e processada, constataram teores baixos de histamina nesses produtos, sendo que o atum enlatado apresentou os maiores níveis, que variaram de 1,60 a 7,41mg/100g. Na

Tabela 3, acham-se relacionadas quantidades de histamina detectadas nos alimentos estudados.

TABELA 3. Conteúdo de histamina em diferentes tipos de pescado (TAYLOR et al., 1978)

Produtos	Número de Amostras	Histamina (mg%)	Concentração média de Histamina (mg%)
Atum enlatado	11	1.60-7.41	3.46
Albacore enlatado	11	0,66-2.21	1.45
Cavala enlatada	18	1.20-4.50	2.25
Sardinha enlatada	10	0.31-1.38	0.79
Lagosta congelada	4	0.09-0.27	1.16
Siri fresco	5	0.05-0.24	0.13
Marisco fresco	6	0.06-0.32	0.19
Ostra fresca	7	0.04-0.64	0.18

Segundo SHALABY (1994), produtos cárneos fermentados são passíveis de conterem histamina, tendo sido relatadas quantidades significantes em salsichas secas fermentadas, nos três primeiros dias de fermentação do produto. Bebidas fermentadas também podem conter quantidades significantes de histamina (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1996). Alguns autores como ZEE et al. (1981) IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996) apontam a cerveja e o vinho, como as bebidas fermentadas que oferecem maior risco potencial em relação à intoxicação histamínica. IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996), analisando cervejas européias, encontraram histamina em um nível muito baixo, na faixa de 0,5 a 1,1 mg/l em 50% das amostras estudadas. De acordo com esses mesmos autores, níveis maiores, de histamina, poderiam indicar presença de microrganismos contaminantes tanto na matéria-prima como no produto final, comprometendo a qualidade dos mesmos. Por outro lado, SHALABY (1994), relatou que

concentrações de histamina em nível de 20mg/l já foram detectadas em cervejas suecas, francesas e dinamarquesas. Os sintomas mais comuns observados após o consumo de bebidas fermentadas contendo altos teores de histamina foram cefaléia e urticárias, muitas vezes manifestados logo após a ingestão (SHALABY, 1994).

Em relação aos queijos, sabe-se que normalmente não apresentam teores relevantes de histamina, embora os maturados possam evidenciar valores mais elevados (SHALABY, 1994). LEITÃO, SILVEIRA & BALDINI (1995), avaliando a presença de histamina em queijos tipo minas padrão e prato consumidos no Estado de São Paulo-Brasil, constataram valores muito baixos, com níveis máximos de 1,41 mg/100g e 1,75 mg/100g para queijo prato e minas, respectivamente, concluindo que esses tipos de queijos oferecem um risco reduzido de acúmulo de histamina.

Quanto aos vegetais, existem relatos na literatura de que os produtos fermentados como o chucrute, normalmente apresentam teores bem baixos de histamina, evidenciados com maior frequência na fase final da fermentação (LÉHANE & OLLEY, 2000).

Em produtos alimentícios destinados ao consumo animal, como rações industrializadas na forma de "pellets", existem poucos relatos quanto aos teores de histamina e seus efeitos. A literatura se restringe especialmente à divulgação informal, distribuída em boletins técnicos, chamando a atenção para alguns sintomas no animal que implicam em perdas econômicas para o produtor. MAZZUCO (1997) relatou a presença de teores elevados de histamina em rações para aves. Embora não se conheça o limite crítico, sabe-se que ela pode provocar problemas em frangos, afetando a mucosa intestinal, rins e fígado, afetando também o crescimento das aves, além de causar diarreia e despigmentação.

De acordo com SHALABY (1994) embora a histamina ocorra em vários alimentos, os peixes e derivados são, devido a seus próprios fatores intrínsecos, os alimentos mais significativos quanto a possibilidade de veicularem uma intoxicação alimentar histamínica.

RODRIGUEZ–JEREZ, MORA-VENTURA & CIVERA (1994) relacionam a presença de histamina em peixes com os seguintes fatores: (a) espécie, principalmente em peixes de musculatura vermelha; (b) concentração de histidina livre, que é mais significativa em peixes (c) presença de microrganismos descarboxilantes da histidina livre; (d) temperatura de conservação do pescado, onde nem sempre a cadeia de frio prevalece; (e) manipulação e processamento inadequados.

Há relatos na literatura de que mesmo os peixes embalados a vácuo não estão livres de apresentarem altos teores de histamina. A este respeito, WEI et al. (1990) estudando o efeito da embalagem à vácuo em atum armazenado a 10°C e a 2°C constataram que esse tipo de embalagem não afetou, significativamente, o crescimento das bactérias histamina positivas. Entretanto, observaram que a temperatura baixa se mostrou mais eficiente do que o próprio vácuo, uma vez que houve uma maior multiplicação bacteriana nas amostras armazenadas a 10°C.

3.4. Metodologia analítica para histamina

A metodologia analítica quantitativa para detecção de histamina em alimentos envolve métodos complexos, onerosos e de resultados demorados. De acordo com TAVARES (1997), a Portaria 185/97, recomenda para os países do MERCOSUL o uso de métodos fluorimétricos descrito pela AOAC (1995); já a Comunidade Econômica Européia, preconiza o uso da cromatografia líquida de alta pressão- HPLC como método ideal de dosagem da amina (LISTON, 1994).

SERRAR et al. (1995) utilizaram métodos imunoenzimáticos-ELISA, do tipo competitivo, como um procedimento de alta sensibilidade e rapidez na detecção de histamina em tecido muscular de pescado, com resultados comparáveis à metodologia usando a técnica HPLC. LÉHANE & OLLEY (2000) e PRICE (1999), relatam que testes imunoenzimáticos, na forma de kits rápidos, têm sido utilizados com sucesso, pelas indústrias de pescado, e entre eles destaca-se o Histamarine Test Kit, da Immunotech-França, aprovado pela AOAC e com sensibilidade de 0,5 ppm, que quantifica histamina em peixes na faixa 1 a 500 ppm, em

aproximadamente, 1 hora. Outros autores, entre eles FUNG (1992), destacam a importância do desenvolvimento de métodos alternativos rápidos aplicados em procedimentos de controle de qualidade de processos industriais. Estes métodos devem apresentar boa reprodutibilidade e baixa taxa de resultados falso-positivos, quando comparados aos métodos tradicionais. Uma desvantagem frequente destes métodos é o custo, considerado muito alto, comparativamente à metodologia tradicional (ANONYMOUS, 1999; LÉHANE & OLLEY, 2000; BOVERCID, IZQUIERDO-PULIDO & VIDAL-CAROU, 2001).

3.5. Dados epidemiológicos sobre histamina em alimentos

A primeira menção sobre a detecção de histamina em alimentos e relação com problemas de saúde data de 1828, em pescado. Esse relato vem de um episódio ocorrido nesse ano, em um navio na Grã-Bretanha, no qual 5 marinheiros apresentaram sintomas de intoxicação histamínica após o consumo de bonito (*Sarda sarda*) (HENDERSON, 1830, citado por LÉHANE & OLLEY 2000). Uma outra ocorrência histórica é datada de pouco mais de oito décadas mais tarde, no ano de 1912, relacionando sintomas de intoxicação histamínica com consumo de peixes; porém, não se tem mais detalhes do ocorrido. No entanto, somente no ano de 1944 é que foi comprovada a relação entre a presença de histamina em alimentos e problemas de saúde, quando um pesquisador revelou sintomas alérgicos ao manipular peixes deteriorados contendo altos teores de histamina (FOO, 1975). Desde então, quando surgem doenças de origem alimentar causadas pelo consumo de pescado, a presença de histamina, nesse tipo de alimento, frequentemente tem sido investigada (LIPP & ROSE, 1997).

De acordo com TAYLOR (1986) não há, no entanto, registros considerados exatos da incidência de intoxicação histamínica na maioria dos países, uma vez que pela natureza branda da doença e seu pouco tempo de duração, os pacientes, na maioria das vezes, nem chegam a procurar assistência médica. MAVROMATICS & QUANTICK (2002) também afirmam ser subestimado a nível mundial o número de pessoas que já apresentaram intoxicação histamínica,

principalmente devido à falhas na divulgação de informações técnicas a respeito dessa doença.

A partir de 1970, os países que mais registraram surtos de intoxicação histamínica foram os países do Reino Unido, Japão e Estados Unidos da América do Norte. No ano de 1986, muitos surtos ocorreram em países da Europa, incriminando peixes enlatados, principalmente sardinha (*Sardina pilchards*) importados da África (Marrocos). No entanto, a partir desse ano, os países europeus desenvolveram e se adequaram a padrões e programas de qualidade incluindo a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, e as incidências parecem ter diminuído (ABABOUC, 1991).

Entre os países asiáticos, o Japão foi o que mais apresentou o problema de intoxicação histamínica, com registros desde o início da década de 50. De 1970 a 1980, foram relatados 42 surtos com 4122 casos registrados, originados na maioria das vezes, do consumo de atum e anchovas. (MITCHEL, 1993). De acordo com LÉHANE & OLLEY (2000), o maior surto de intoxicação histamínica que se tem registro em nível mundial, ocorreu no Japão em 1973, envolvendo o consumo de cavalinha desidratada (*Scomber japonicus*), com 2656 casos confirmados. Parece incoerente o fato do Japão, um país que tradicionalmente consome peixe na forma crua, registrar um surto dessa natureza envolvendo peixe processado. Porém, as pesquisas esclareceram que os peixes utilizados para o consumo na forma crua são aqueles que normalmente apresentam uma qualidade microbiológica superior (LÉHANE & OLLEY, 2000).

Na Oceania, especialmente Austrália e Nova Zelândia, há poucos registros sobre a ocorrência de surtos de intoxicação histamínica (FLETCHER, BREMER & OSBORNE, 1999). Porém de acordo com TAYLOR (1985), de 1973 a 1975 muitos incidentes ocorreram, especialmente na Nova Zelândia, associados a peixes enlatados e, registros mais recentes, têm sido raros.

Em relação ao continente europeu, de acordo com BARTHOLOMEW et al. (1987), depois do surto ocorrido em 1828 na Grã-Bretanha, não se tem registro de ocorrências até 1976, ano em que diversos surtos ocorreram principalmente na

Inglaterra e Escócia, associados ao consumo de atum e sardinha. O Reino Unido registrou de 1976 a 1990, 441 incidentes dessa natureza, com 926 casos. Outros casos esporádicos também foram registrados nesses países. Na Suíça, no período de 1966 a 1991, 76 incidentes de intoxicação histamínica foram registrados. (LÉHANE & OLLEY, 2000).

Na América do Norte, principalmente Estados Unidos e Canadá, alguns casos foram relatados, sendo o primeiro confirmado apenas em 1975, embora muitos outros devam ter ocorrido anteriormente, sem que tenham sido registrados (LÉHANE & OLLEY, 2000). De acordo com TODD (1997), apenas no mês de outubro de 1987, o Canadá registrou 14 casos de intoxicação histamínica, devido ao consumo de arenque defumado importado e, em agosto de 1994, nesse mesmo país, foram relatados mais 12 casos devido ao consumo de atum fresco, com níveis de histamina variando de 28 a 710 mg/100g. Segundo LANGE (1998), nos Estados Unidos da América do Norte, é difícil determinar a real incidência de intoxicação histamínica, devido aos registros incompletos, erros de diagnóstico e omissões das próprias pessoas que se contaminaram. No entanto, dados registrados no Centro de Controle de Doenças (CDC, Center for Disease Control, Estados Unidos da América do Norte), mostram que o Havá e a Califórnia são os estados americanos que anualmente registram um maior número de casos de intoxicação histamínica. LIPP & ROSE (1997), relataram que no ano de 1997, a intoxicação histamínica, pelo consumo de peixes e derivados, foi a doença de origem alimentar mais comum nos Estados Unidos, superando até as ocorrências de toxinfecções alimentares.

MACAN et al. (2000) descrevem uma ocorrência de intoxicação histamínica nos Estados Unidos, na qual operários de uma indústria de farinha de peixes evidenciaram os sintomas característicos de intoxicação após 30 minutos do início do manuseio de sacas contendo o produto.

De acordo com MERSON et al. (1974) e LÉHANE & OLLEY (2000), de maneira diferente do que ocorre no Japão, os surtos relatados nos Estados Unidos da América do Norte, sempre envolveram um número pequeno de

peessoas. Porém, o maior deles, ocorrido em 1973 apresentou 254 casos clínicos envolvendo 8 estados, devido à ingestão de atum enlatado, que apresentava teores de histamina que variavam de 68 a 280 mg/100g.

Em relação ao Brasil, dados estatísticos oficiais sobre ocorrências de surtos de intoxicação histamínica são inexistentes, embora provavelmente tenham ocorrido. São também escassos estudos voltados ao maior conhecimento e conscientização do problema da presença de histamina em alimentos (SASSAKI & RIBEIRO, 1991).

3.6. Padrões de histamina para peixes

Em relação aos padrões que estabelecem níveis permitidos de histamina em peixes e derivados, diferentes países adotaram normas específicas.

BARTHOLOMEV et al. (1987), na Grã-Betanha, apresentaram as seguintes normas de segurança para peixes e derivados, relativos aos teores de histamina. De acordo com os níveis encontrados nos peixes, este seria clasificado da seguinte maneira:

<5mg/100g de peixe - seguro para consumo

5-20mg/100g de peixe - probabilidade de toxidez

20-100mg/100g de peixe - tóxico

>100mg/100g de peixe - altamente tóxico, impróprio para consumo.

Segundo LUTEN et al. (1992) a Comunidade Econômica Européia, adotou no ano de 1991, as seguintes normas para os teores de histamina em peixes: a média do conteúdo de histamina em 9 amostras de peixe não poderia exceder o nível de 10 mg/100g; duas amostras poderiam conter mais que 10 mg/100g de peixe, porém, menos que 20 mg histamina/g100g; e nenhuma amostra poderia conter mais de que 20 mg de histamina/100g de peixe.

De acordo com HUSS (1993), a Comunidade Econômica Européia, ao fixar o valor de 20mg de histamina/100g de peixe como limite máximo de aceitação, considerou valores entre 50mg a 100mg/100g como sendo "potencialmente perigosos" e acima de 100mg/100g, como "altamente tóxicos".

A Food and Drug Administration (FDA) considera, para atum, um nível de 20mg/100g como evidência de decomposição e 50mg/100g como nível perigoso (LEITÃO, BALDINI & SALES, 1983).

Conforme citações feitas por alguns autores, nos Estados Unidos da América do Norte, ao ser oficializado o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC ou HACCP) para pescado, a detecção de histamina foi considerada um perigo potencial, estabelecendo-se limites entre 5 e 20mg/100g para peixes frescos e enlatados respectivamente (EITENMILLER, ORR & WALLIST, 1978; SOARES & GLÓRIA, 1994). Os padrões alimentares na Austrália e Nova Zelândia permitem quantidades de até 100 mg/kg de alimento (FLETCHER, BREMER & OSBORNE, 1999).

Em relação aos regulamentos vigentes no Brasil, em 1994, a Resolução Mercosul GMC n° 40 aprovou o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de peixe fresco, inteiro e eviscerado, que entrou em vigor em 13/07/97, através da Portaria n° 185 do Ministério da Agricultura e Abastecimento (TAVARES, 1997). Essa legislação estabelece apenas padrões de histamina para se considerar o peixe fresco, o qual deve apresentar no máximo o nível de 10 mg/100g de histamina no músculo, sendo esses peixes pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombreroscidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae* (DIPOA, 1997). Na primeira família encontra-se o atum, mencionado na literatura como sendo a espécie de peixe que apresenta os níveis mais elevados de histamina. (TAVARES, 1997).

Ainda em relação à legislação sobre histamina em peixes, LÉHANE & OLLEY (2000), relatam que está difícil estabelecer um limite regulatório único para esse propósito, uma vez que os níveis considerados tóxicos variam bastante, além do fato dos possíveis potencializadores da ação da histamina não estar bem elucidado. Assim sendo, de acordo com esses mesmos autores, o nível de 50 mg/100g de carne de peixe, considerado pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos da América do Norte, deve ser utilizado como base ao se estabelecer padrões, uma vez que esse nível é baseado em anos de

experiência em investigações e ocorrências, mesmo admitindo a teoria da existência dos potencializadores da ação tóxica da histamina em peixes microbiologicamente alterados.

3.7. Controle da produção de histamina em peixes

Muitas medidas preventivas podem ser tomadas para controlar a formação de histamina em alimentos de um modo geral. A natureza do alimento deve, no entanto, ser considerada no desenvolvimento de tais medidas de controle (TAYLOR, 1990). Considerando-se os peixes, a estocagem a baixas temperaturas, boas práticas de fabricação e higiene são medidas fundamentais para o controle de bactérias formadoras de histamina; sabe-se, no entanto, que essas práticas muitas vezes são difíceis de serem implementadas em certos locais, especialmente considerando a pesca artesanal.

De acordo com LEITÃO, BALDINI & SALES (1983), a prevenção de problemas relacionados com o acúmulo de histamina em peixes deve envolver a utilização de matéria-prima de boa qualidade, e principalmente a garantia da continuidade da cadeia de refrigeração nas várias etapas da produção, desde a captura, incluindo o tempo e temperatura em que o peixe ou pescado permanece no barco pesqueiro, transporte, recepção na indústria, até a obtenção do produto final. De acordo com esses autores, deve-se assegurar especialmente que o pescado não seja mantido em temperaturas na faixa de 15°C a 35°C por períodos muito prolongados, uma vez que é neste intervalo que as bactérias produtoras de histamina evidenciam máxima atividade.

OKUZUMI, OKUDA & KUBOZUKA (1984), estudando a ocorrência de bactérias produtoras de histamina em arenque, nas diferentes estações do ano, constataram que em épocas mais quentes, a ocorrência destas é mais significativa, e a predominância de *Morganella morganii* é relevante nesses períodos. KIM et al. (2000), avaliando a influência da temperatura de abuso na produção de histamina em pescado salgado inoculado com bactérias histamina-

positivas, observaram que o maior nível de produção de histamina foi constatado à temperatura ao redor de 25°C.

KIM, NA & PRICE (1999), estudando a formação de histamina e a relação com a temperatura de conservação de pescado marinho, observaram que em peixe armazenado em gelo por 18 dias não foi detectada esta amina. Os autores sugeriram que este fato possa ter ocorrido porque as principais bactérias produtoras de histamina conseguem se desenvolver bem apenas em temperaturas maiores que 15°C, sendo que, a 25°C, obtiveram os maiores níveis de histamina na faixa de 60mg/100g após sete dias de armazenamento.

FLETCHER, BREMER & OSBORNE (1999) também enfatizaram a importância da manutenção da cadeia de frio, desde a matéria-prima até o produto final, como pré-requisito essencial para evitar que bactérias produtoras de histamina se desenvolvessem, tornando o produto potencialmente perigoso ao consumidor. Citaram, ainda, que a prevenção da formação de altos níveis de histamina em peixes e derivados, que iriam receber algum tipo de tratamento térmico no processo seria obtida pela manutenção destes em temperaturas de refrigeração após a captura e pela eliminação das bactérias produtoras de histamina pelo tratamento térmico aplicado.

De acordo com LUTEN et al. (1992) e LÉHANE & OLLEY (2000), incidentes de intoxicação por histamina após a ingestão de peixes são devidos principalmente, à má qualidade da matéria-prima e condições higiênicas deficientes no processo, que levariam a um aumento da microbiota superficial e à produção de histamina em níveis considerados tóxicos. De acordo com KIM et al. (2001), a otimização das operações de processamento e adoção de práticas de higiene e manutenção da cadeia de frio, resumem os pré-requisitos para a produção de alimentos com baixos teores de histamina.

Analisando filés de cavala (*Scomber japonicus*), bagre africano (*Silorus sp*) e truta (*Oncorhynchus myrkis*) armazenados a 4°C e a 24°C, EDMUNDS & ETTENMILLER (1975) verificaram intensa formação de histamina na temperatura mais elevada, ao passo que na menor praticamente não havia produção, mesmo

após 14 dias de armazenamento. ARNOLD & BROWN (1978) e KIM et al. (2000), também relatam que em temperaturas abaixo de 0°C a formação de histamina é praticamente nula, não sendo também observada sua formação em temperaturas acima de 40°C.

De acordo com LÉHANE e OLLEY (2000), a temperatura interna de alguns peixes pode também influenciar a produção de histamina. Relatam que o atum, quando vem à superfície das águas ao ser capturado, tem sua temperatura interna ao redor de 32°C e a deterioração nessa temperatura é aproximadamente trinta vezes mais rápida do que a 0°C. Por isso a fase mais crítica do processamento do atum, segundo esses mesmos autores, é o momento da captura, havendo assim a necessidade de um resfriamento rápido logo após essa etapa

Essas condições recomendadas, no entanto, dificilmente ocorrem na pesca artesanal, onde o peixe pode ficar exposto por períodos prolongados a temperaturas de abuso.

Na indústria, especialmente em países desenvolvidos, o problema de intoxicação histamínica tem diminuído com a introdução dos princípios de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e Boas Práticas de Fabricação, que envolvem a prevenção de contaminação e adoção de procedimentos de controle de qualidade no processamento, tendo início por ocasião da captura do peixe até a distribuição ao consumidor final (KIM et al., 2001). BARTRAM (1997) relatou que em peixes considerados de boa qualidade para o consumo na forma "in natura", em pratos típicos orientais, a qualidade poderia ser assegurada por programas do tipo APPCC, nos quais a temperatura dos filés e exames organolépticos frequentes seriam considerados pontos críticos de controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material e procedimento de amostragens

Os estudos para microbiota foram efetuados analisando-se 3 espécies diferentes de peixes: a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), a carpa (*Cyprinus carpio*) e a truta arco-iris (*Oncorhynchus myrkis*). Exemplos destas espécies foram capturados em tanques de criação do Instituto de Pesca, localizados nas cidades de Pindamonhangaba (tilápias), São Paulo (carpas) e Campos do Jordão (trutas) (Figura 3). As amostragens foram efetuadas nas 4 épocas diversas ao longo de 12 meses, correspondentes às diferentes estações do ano. Os peixes foram capturados nos tanques de criação pela técnica de redes de arrasto. Em cada amostragem foram coletados 5 exemplares de cada espécie em estudo, mencionando ainda que o operador utilizou sacos plásticos estéreis, na separação manual dos peixes, sendo estes embalados nesses mesmos sacos plásticos e acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo em escamas, seguido de transporte imediato ao Laboratório do Núcleo de Microbiologia do ITAL, Campinas, SP. Assim sendo neste item foram examinadas 60 unidades de amostras, sendo estudadas 20 unidades para cada espécie de peixe. Além das espécies mencionadas, também foi pesquisada a presença de histidina livre, aminoácidos livres totais e de histamina em exemplares de curimatá (*Prochilodus scrofa*), com as amostragens efetuadas em 2 épocas diversas do ano (inverno e verão) sendo portanto mais 10 unidades de amostra analisadas. Exemplos de curimatá também foram utilizados na confecção do extrato de tecido muscular estéril, e para retirada dos filés, para os estudos de armazenamento. As amostras de curimatá foram adquiridas em um pesqueiro da região de Campinas-SP.



FIGURA 3. Tanque de criação de trutas da Estação Experimental do Instituto de Pesca de Campos do Jordão-S.Paulo

4.2. Procedimento experimental

4.2.1. Contagem microbiana total de psicotróficos, mesófilos e de bactérias presuntivamente histamina-positivas em ágar Níven da superfície de peixes

As amostras de peixe, foram retiradas dos plásticos em cabine de fluxo laminar, sendo as amostras para a análise microbiológica obtidas da superfície de cada exemplar de peixe, utilizando-se a técnica de zaragatoa (esfregaço), que era friccionada em 2 (duas) áreas de 2 x 5cm (10 cm²), delimitadas por moldes metálicos estéreis, na região dorsal de cada peixe examinado, totalizando assim 20cm² de área amostrada/exemplar (**Figura 4**). A seguir, as zaragatoas eram colocadas em tubos contendo 5 mL de água peptonada 0,1%, seguido de

agitação em agitador vibratório tipo vortex. A partir das suspensões iniciais foram preparadas diluições decimais sucessivas em água peptonada 0,1%, seguido da adição de 1mL de cada diluição em placas de Petri. A seguir, adicionou-se o meio de diferenciação para bactérias histamina-positivas (ágar Niven) contendo triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2,7%, HCl 0,5%, NaCl 0,5%, CaCO_3 0,1%, ágar 2,0%, e vermelho de cresol 0,02% (NIVEN et al. 1981), utilizando-se a técnica de "pour plate", com sobrecamada do mesmo meio. Em continuação, as placas foram incubadas a temperaturas de 35°C e 20°C, por períodos de 48 e 72 horas, respectivamente, caracterizando-se a população de mesófilos (35°C), psicrotrófilos (20°C) totais que cresceram nesse meio, e diferenciando-se as colônias típicas presuntivamente histamina positivas, caracterizadas pela presença de um halo arroxeadado, indicativo da alcalinização do meio pela presença da amina. Os resultados foram expressos em Log UFC/cm².



FIGURA 4. Amostragem dos peixes pela técnica de esfregaço.

4.2.2. Identificação das culturas presuntivamente histamina-positivas e confirmação de capacidade de produção de histamina

As culturas típicas presuntivamente histamina-positivas foram submetidas a identificação a nível de gênero ou espécie, de acordo com KRIEG & HOLT (1994) e com auxílio do sistema bioquímico miniaturizado Crystal-BD (BBL), que utiliza substratos cromogênicos e convencionais modificados.

Após identificação, as culturas presuntivamente histamina-positivas foram confirmadas quanto a capacidade de produção de histamina, através de uma seqüência de testes propostos por YOSHINAGA & FRANK (1982), a saber:

i) Inoculação da cultura em tubos contendo ágar Níven modificado (triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2%, NaCl 0,5%, vermelho de bromocresol 0,02%, ágar 1,5%).

ii) Crescimento em caldo de Níven modificado, acrescido de 0,1% de glicose e mantido em tubos contendo tubos de Duhran invertidos.

As culturas presuntivamente histamina-positivas foram consideradas confirmadas pela produção de gás no caldo de Níven, com desenvolvimento de coloração roxa intensa devido a alcalinização do meio Ágar Níven modificado.

4.2.3. Avaliação presuntiva da produção *in vitro* de outras aminas biogênicas

As culturas típicas mencionadas no item 4.2.2 foram também analisadas quanto à capacidade de descarboxilação de arginina, lisina e tirosina, com produção das respectivas aminas. O meio de cultivo utilizado foi o proposto por YAMANII & UNTERMANN (1985) (peptona bacteriológica 0,2%, NaCl 0,5% aminoácido teste 1%, vermelho de clorofenol 0,2%), sendo a reação positiva baseada na mudança de coloração do indicador para uma tonalidade arroxeada e elevação do pH inicial de 5,3 para valores acima de 7,1. As culturas testadas foram incubadas nas temperaturas de 5°, 15° e 30°C, por períodos máximos de 6 dias.

4.2.4. Quantificação de histamina produzida *in vitro*, por culturas selecionadas

Com base na frequência de ocorrência na microbiota contaminante e na capacidade de produção de histamina, previamente testadas, foram selecionadas algumas culturas para estudos complementares de quantificação da produção de histamina. Assim, essas culturas foram inoculadas em caldo de Níven, seguido de incubação a 5, 15 e 35°C, com dosagem de histamina nos intervalos de 1, 3 e 6 dias. A quantificação dos teores de histamina foi feita de acordo com a metodologia proposta por FOO (1975) e CATTANEO & CANTONI (1978), empregando cromatografia ascendente em papel, eluição das bandas em metanol e leitura em espectrofotômetro a 500 nm.

4.2.5. Determinação de histidina livre, aminoácidos totais livres e histamina em tecido muscular de peixes

As análises de histamina foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por FOO (1975) e CATTANEO & CANTONI (1978) utilizando cromatografia em papel Whatman n° 3 MM e fundamentada na formação de um complexo de coloração rósea entre o reagente ninidrina-cádmio e a histamina. Este complexo foi eluído com metanol, seguido de leitura em espectrofotômetro a 500nm, contra um branco preparado de forma idêntica.

O extrato para cromatografia foi preparado mediante a homogeneização da amostra com solução de ácido tricloroacético a 5%, na proporção de 1:3. A seguir, o material foi mantido sob agitação durante 1 hora, à temperatura ambiente, seguido de centrifugação (1.000G, 15 minutos); ao sobrenadante adicionou-se 1 ml de solução de ácido sulfúrico 0,1 N, extraindo-se com três porções de 20 mL de éter etílico. A fase aquosa foi então concentrada até pequeno volume, sob pressão reduzida e o resíduo foi diluído a 10 mL com metanol-água (4+1); finalmente, este extrato foi usado diretamente na cromatografia de papel.

Para as determinações de histidina livre e aminoácidos livres totais, o extrato foi preparado de forma semelhante àquela usada nas determinações de histamina, omitindo-se a etapa da concentração. Após a lavagem com éter etílico, o extrato foi ajustado para um volume definido, sendo uma alíquota diluída em tampão pH 2,2 e analisada em analisador de aminoácidos DIONEX DX-300, usando-se coluna de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina.

4.2.6. Testes de armazenamento de extrato de tecido muscular estéril de curimatá inoculado com *Morganella morganii*.

O homogeneizado foi preparado pela trituração da amostra de tecido muscular de curimatá em homogeneizador de pistão tipo "stomacher" (Blender 400), na proporção de 1 parte de carne para 2 de água destilada, seguido de cocção a 72°C por 10 minutos. Em continuação, alíquotas de 20g. foram colocadas em tubos de 20 x 250 mm de diâmetro com posterior esterilização a 121°C durante 15 minutos. Após o resfriamento os tubos foram inoculados com 1,0 mL de cultura pura de *Morganella morganii*, ao nível de 10⁴UFC/g, isolada previamente da superfície de carpa. Os tubos, em duplicata, foram incubados nas temperaturas de 5°, 15° e 30 °C e com leituras nos intervalos de 1, 3 e 6 dias.

Nesta etapa da pesquisa as dosagens de histamina foram feitas utilizando-se o método rápido, de ELISA, com o Histamarine enzyme immunoassay kit (cat. N° 2369), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante, que define um limite mínimo de detecção de 0,05 µM/L.

Na quantificação das bactérias histamina-positivas foi feita uma contagem inicial na amostra inoculada, mantendo-se sempre uma amostra-controle (sem inoculação) para cada tratamento. Na análise microbiológica, nos diferentes dias de amostragem e nas 3 temperaturas estudadas, retirou-se uma alíquota de 25g de cada amostra (12,5g de cada tubo da duplicata) e colocou-se em sacos estéreis utilizados no homogeneizador de pistão tipo "stomacher" (Blender 400), juntamente com 225 mL de água salina peptonada, com posterior diluição decimal, seguida de inoculação de 1 mL de cada diluição em ágar Níven. Na

seqüência, as placas eram incubadas a temperatura de 30°C por 48 horas, e as colônias típicas (arroxeadas, com um halo púrpura) foram contadas. Os resultados foram expressos em logaritmo das unidades formadoras de colônias por grama de extrato muscular de curimatá (log UFC/g).

4.2.7. Testes de armazenamento de filés de curimatá inoculados com *Morganella morganii*

Os filés de curimatá foram acondicionados em bandejas sob fluxo laminar, em condições de higiene controladas (facas esterilizadas, bandejas limpas e estéreis, manuseio adequado). O inóculo no nível de 10^4 UFC/mL da bactéria histamina-positiva, *Morganella morganii*, com 18 horas de incubação, foi preparado a partir de cultura pura isolada de carpa. Após homogeneização, 1,0 mL da cultura foi inoculado em cada filé, sendo 0,5 mL em cada lateral, com os filés sendo embalados individualmente em sacos plásticos estéreis e colocados em bandejas limpas. Em cada bandeja foram acondicionados 5 filés, sendo as mesmas incubadas a 5°C, 15°C e 30°C. Nos intervalos de 1, 3 e 6 dias eram retiradas amostras para as dosagens de histamina e contagens da microbiota histamina positiva. As dosagens de histamina foram efetuadas pelo método rápido, de ELISA (Histamarine enzyme immunoassay kit cat. n° 2369).

Na contagem da microbiota histamina-positiva seguiu-se o mesmo procedimento analítico descrito em 4.2.6., sendo que, neste caso, 25 g de amostra foram retirados dos diferentes filés inoculados e incubados nas condições anteriormente descritas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Microbiota superficial das amostras de peixes

Em referência às contagens de bactérias totais em ágar Níven, observou-se que as populações iniciais foram relativamente baixas, com um máximo de 4,76 logUFC/cm² (**Tabela 4**) não atingindo os limites máximos estabelecidos nas especificações de qualidade de pescado que é de 7,0 logUFC/cm² (HUSS, 1993). Na época de inverno, em Campos do Jordão, onde a temperatura média da água estava ao redor de 8°C (indicada por termômetros colocados nos próprios tanques de criação) houve a prevalência de microbiota psicrófila enquanto que no verão (temperatura média da água ao redor de 21°C), uma microbiota mesófila predominou em todas as regiões. Nas outras estações do ano, nas quais as oscilações de temperatura não foram pronunciadas, foi observado um relativo equilíbrio entre a microbiota mesófila e psicrófila (**Tabela 4**).

É importante destacar que a possibilidade de que os valores de contagem total de bactérias obtidos em ágar Níven, provavelmente podem ter sido inferiores aos que seriam constatados pelo uso de meios como ágar-padrão de contagem ou ágar tripticase soja, que têm uma composição e valores de pH mais adequados ao crescimento microbiano de um modo geral. No entanto, NÍVEN, JEFFREY & CORLETT (1981), estudando o ágar Níven em comparação com o meio agar-padrão para contagem (Plate Count Agar, DIFCO), constataram que as contagens bacterianas totais eram mais baixas do que as obtidas em agar-padrão, em apenas um ciclo logarítmico, valor esse considerado irrelevante por esses autores, que citam ainda a inviabilidade da utilização de meios de cultura para contagem padrão quando se objetiva a identificação de microbiota produtora de histamina, uma vez que estes meios não são diferenciais. LEITÃO et al. (1983), citam que o meio de ágar Níven é considerado o mais adequado para identificar as bactérias presuntivamente histamina-positivas, no qual as colônias típicas se apresentam maiores que as demais e são de uma coloração roxa característica, devido a alcalinização do meio de cultura, pela formação da histamina nesse

meio. As colônias típicas normalmente aparecem nesse meio envoltas em um halo dessa mesma cor, ou seja, purpura, sendo facilmente diferenciadas das demais. Quanto ao pH mais baixo desse meio de cultura, convém mencionar que é um fator intrínseco importante, uma vez que valores de pH mais adequados à produção da histamina se encontram na faixa de 5,0 a 5,5 (IENISTEA, 1973). Esses dados são concordantes com MAVROMATIS & QUANTICK (2002), que, estudando as características do ágar Níven e sua adequabilidade na enumeração de bactérias formadoras de histamina, obtiveram que o pH desse meio não mostrou ser um fator intrínseco de efeito inibitório ao isolamento dessas bactérias, bem como na microbiota total, utilizando como referência o meio de cultura para contagem padrão em placas (Plate Count Agar), em pH 7, concluindo ainda que, em valores de pH na faixa de 5,3 a 5,5 as bactérias produtoras de histamina, em ágar Níven, são claramente distinguíveis das demais.

TABELA 4. Microbiota mesófila (35°C) e psicrótrófica (20°C) em superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre.

Natureza da amostra	Contagem (Log UFC/ cm ²)*							
	Época I		Época II		Época III		Época IV	
	(Primavera 17°C)**		(Verão 21°C)**		(Outono 18°C)**		(Inverno 8°C)**	
	20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C
Carpa	2,04	2,04	2,38	4,46	3,54	1,54	4,76	2,53
Tilápia	2,49	2,19	1,70	4,59	2,92	2,25	2,88	1,40
Truta	3,27	2,39	3,46	3,68	3,54	2,66	4,07	1,60

*Média de 5 repetições por espécie de peixe

**Temperatura média dos tanques de criação na época da coleta

Por outro lado, foi observado na presente pesquisa que as contagens de bactérias histamina-positivas foram muito reduzidas em praticamente todas as amostras analisadas, indicando ser esta população bastante restrita nos peixes de água doce. No total de unidades de amostra analisadas (60), foram isoladas

apenas 49 culturas presuntivamente histamina-positivas. Os dados se encontram na **Tabela 5**.

TABELA 5. Culturas presuntivamente histamina-positivas isoladas da superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre.

Microorganismo	Origem das culturas						Total	
	Carpa		Tilápia		Truta		Nº	%
	20°C*	35°C**	20°C*	35°C**	20°C*	35°C**		
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	-	-	01	-	-	-	01	2,0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	03	-	03	02	01	-	09	18,4
<i>Aeromonas veronii</i>	01	-	-	-	-	-	01	2,0
<i>Citrobacter freundii</i>	03	-	-	-	-	-	03	6,1
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	-	-	01	01	-	-	02	4,1
<i>Kluyvera ascorbata</i>	-	-	-	01	-	-	01	2,0
<i>Morganella morganii</i>	01	-	02	01	01	-	05	10,2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	07	-	03	04	01	01	16	32,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	02	-	-	-	02	4,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	02	-	-	-	-	-	02	4,1
<i>Pseudomonas putida</i>	03	-	01	-	-	01	05	10,2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	-	02	-	-	-	02	4,1
TOTAL	20	0	15	09	03	02	49	100

*Temperatura de incubação de contagem de psicrotróficos.

**Temperatura de incubação para a contagem de mesófilos

Inicialmente, observou-se que a maioria das culturas presuntivamente histamina-positivas foi isolada à temperatura de 20°C indicando, portanto, a predominância de espécies psicrotróficas na microbiota presuntivamente produtora de histamina das amostras de peixes estudadas. Na temperatura de 35°C, apenas 11 (20,5%) das culturas evidenciaram este comportamento.

Outra observação interessante é que, independentemente da temperatura de incubação, houve uma prevalência de bactérias presuntivamente histamina-positivas nos peixes provenientes de águas mais quentes, características das regiões de São Paulo e Pindamonhangaba, em comparação aos peixes oriundos de águas mais frias, caso específico da região de Campos do Jordão. Assim, 44 culturas (89,8%) eram provenientes das primeiras regiões e apenas 5 (10,2%) foram isoladas das trutas capturadas em Campos do Jordão.

Por outro lado, analisando-se a prevalência de bactérias presuntivamente histamina-positivas em função da espécie de peixe, constatou-se a maior ocorrência em tilápias (24 culturas, 49,0%), seguido de carpas (20 culturas, 40,8%), e finalmente de trutas (5 culturas, 10,2%). É evidente que estes comentários devem ser analisados com precaução, pois inúmeros fatores, além da espécie de peixe e condições de temperatura, podem influir na natureza da microbiota contaminante, entre eles a qualidade e teor de matéria orgânica nas águas dos tanques, contaminação fecal do manancial, entre outros.

A reduzida presença das bactérias histamina-positivas nas amostras analisadas vem confirmar observações de outros autores. LEITÃO, BALDINI & SALES (1983), estudando bactérias histamina-positivas em pescado de origem marinha, observaram uma ocorrência de populações reduzidas desses microrganismos em pescado marinho, atribuindo na ocasião tal fato às deficiências que o ágar Níven.

GENNARI, TOMASELLI & COTRONA (1999), estudando a microbiota de sardinhas frescas (*Sardinella pilchardus*), capturadas no mar Mediterrâneo, observaram a predominância das bactérias deteriorantes, principalmente *Pseudomonas* sp, *Flavobacterium* sp e *Shewanella* sp e em menor proporção, as da família *Enterobacteriaceae*, sendo que *Morganella morganii* foi a única espécie bacteriana confirmada como produtora de histamina, em um total de 57 culturas isoladas.

Em relação à identificação da microbiota presuntivamente histamina-positiva na presente pesquisa caracterizou-se a predominância de espécies da

família *Vibrionaceae* (26 culturas, 53,1%), *Pseudomonadaceae* (11 culturas, 22,4%) e *Enterobacteriaceae* (9 culturas, 18,4%). Quando consideradas individualmente, conforme mostra a **Tabela 5**, houve a prevalência de *Plesiomonas shigelloides* (32,6%), *Aeromonas hydrophilla* (18,4%) e *Morganella morganii* (10,2%) entre as espécies presuntivamente histamina-positivas.

Ao lado da eventual capacidade de produção de histamina, a presença de *Aeromonas hydrophila* e *Plesiomonas shigelloides*, reveste-se de grande importância no aspecto de saúde pública. Estas espécies têm como habitat principal o ambiente aquático principalmente fluvial e por essa razão são detectadas com freqüência na microbiota de peixes de água doce. Conforme relatado por KIROV (1997), existem fortes evidências em relação à patogenicidade destas espécies, podendo provocar gastroenterites e, por vezes, infecções extra-intestinais (endocardites, pneumonia, conjuntivite, infecções renais, etc.)

As culturas isoladas e identificadas como prováveis produtoras de histamina foram submetidas a testes confirmatórios propostos por YOSHINAGA & FRANK (1982), como descrito no item 4.2.2. Os resultados obtidos estão contidos na **Tabela 6**.

TABELA 6. Bactérias produtoras de histamina isoladas da superfície de peixes de origem fluvial ou lacustre, confirmadas segundo testes descritos por YOSHINAGA & FRANK (1982).

Microorganismos*	Número de presuntivos	Confirmados **	%
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	01	0	0,0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	09	03	33,3
<i>Aeromonas veronii</i>	01	0	0,0
<i>Citrobacter freundii</i>	03	03	100
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	02	0	0,0
<i>Kluyvera ascorbata</i>	01	0	0,0
<i>Morganella morganii</i>	04	04	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	17	05	29,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02	0	0,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	02	01	50,0
<i>Pseudomonas putida</i>	05	01	20,0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	02	0	0,0
TOTAL	49	17	34,7

*Culturas incubadas a temperaturas de origem do isolamento (20°C ou 35°C)

** Número de espécies microbianas que apresentaram reações positivas com até 48h. de incubação.

Uma observação prática de grande importância foi a constatação de que espécies que apresentaram reação intensa em ágar Níven, como *M. morganii*, foram integralmente confirmadas como histamina-positivas segundo os procedimentos de YOSHINAGA & FRANK (1992). Já as demais culturas que apresentaram reação positiva menos intensa, tiveram um percentual reduzido de confirmação no teste citado. Exceção feita a uma cultura de *Morganella morganii*, todas as demais bactérias confirmadas como produtoras de histamina, foram originalmente isoladas a 20°C.

LEITÃO & SILVEIRA (1993), estudando a microbiota produtora de histamina em pescado de origem marinha, constataram que a temperatura ótima para essas bactérias atuarem com maior intensidade, situa-se na faixa entre 10 e 25°C. Essa observação é concordante com os dados de BRANDÃO (1996) e KIM

et al. (2000) que comprovaram que as descarboxilases bacterianas são mais ativas em temperaturas inferiores a 30°C.

5.2. Descarboxilação de outras aminas biogênicas *in vitro*

A Tabela 7 apresenta os resultados presuntivos dos testes de descarboxilação *in vitro* de aminoácidos relevantes pelas culturas histamina-positivas, capazes de gerar outras aminas biogênicas, que podem potencializar a ação da histamina. De um modo geral, observou-se que a 5°C nenhuma das culturas testadas evidenciou atividade descarboxilante, indicando novamente que a refrigeração seria a principal medida preventiva ou barreira para evitar a formação de aminas no pescado.

Em temperaturas de 15°C os resultados foram variáveis com *M. morganii*, revelando maior atividade comparativamente às outras espécies. Este comportamento é similar ao constatado em relação à produção de histamina, sendo que as culturas de *A. hydrophila* e principalmente de *P. shigelloides*, foram bem menos ativas que *M. morganii*. Também foi observado que *A. hydrophila* descarboxilou a lisina apenas no sexto dia de incubação a 15°C, enquanto que *P. shigelloides* não mostrou nenhuma atividade descarboxilante sobre a tirosina.

À temperatura de 30°C, *M. morganii* também revelou maior atividade descarboxilante dos aminoácidos estudados em relação às outras culturas estudadas.

No entanto, em relação à arginina, foi constatado que todas as bactérias selecionadas mostraram ter ação descarboxilante, observando-se resultados positivos(+) em todas elas, no primeiro dia, à temperatura de 15°C.

De acordo com LEHANE & OLLEY (2000), é importante que as bactérias produtoras de histamina também tenham a capacidade de descarboxilar os aminoácidos precursores de outras aminas biogênicas, uma vez que a hipótese da potencialização da histamina por esses compostos deve ser considerada.

TABELA 7. Descarboxilação de alguns aminoácidos por bactérias isoladas de peixes de origem fluvial ou lacustre, sob diferentes condições de incubação

Incubação		Espécies bacterianas e descarboxilação de aminoácidos*								
		<i>A. hydrophila</i>			<i>M. morganii</i>			<i>P. shigelloides</i>		
		ARG	LIS	TIR	ARG	LIS	TIR	ARG	LIS	TIR
1 dia	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15°C	+	-	-	+	+	+	+	+	+
	30°C	+	-	-	+	+	+	+	+	-
3 dias	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15°C	+	-	+	+	+	+	+	-	-
	30°C	+	-	+	+	+	+	+	+	-
6 dias	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	30°C	+	-	+	+	+	+	+	+	-

* Aminoácidos =ARG= arginina, LIS= lisina, TIR = tirosina

Em resumo, constatou-se que *Morganella morganii* foi a bactéria que apresentou maior potencial de descarboxilação dos aminoácidos estudados, nas diferentes condições de incubação analisadas. Muitos autores descrevem ser esta bactéria a que possui maior atividade descarboxilante sobre os aminoácidos que se encontram na forma livre na superfície do pescado, especialmente a histidina. (TAYLOR, 1986; CHEN et al., 1989; LISTON, 1990; TAYLOR, 1990; ABABOUC, 1991; KIM et al., 2000). BRANDÃO (1996) obteve resultados semelhantes ao estudar o potencial de descarboxilação de outros aminoácidos por enterobactérias isoladas de peixes de origem fluvial ou lacustre, constatando que *M. morganii* demonstrou ter potencial para descarboxilar a maioria dos aminoácidos pesquisados, quando incubada em temperatura de 36°C.

Os aminoácidos testados neste estudo têm importância em relação à eventual formação de aminas que potencializam o efeito tóxico da histamina em pescado; assim sendo, os dados obtidos relativos ao potencial de

descarboxilação dos mesmos, levam a concluir que, de maneira geral, temperaturas acima de 15°C, facilmente observadas em condições precárias de armazenamento de pescado, podem possibilitar a formação de outras aminas biogênicas como a cadaverina, tiramina e especialmente a putrescina.

5.3. Avaliação quantitativa da produção de histamina pelas culturas bacterianas selecionadas

Os resultados referentes à avaliação quantitativa da produção de histamina pelas três bactérias selecionadas estão na **Tabela 8**.

TABELA 8. Avaliação quantitativa da produção de histamina (mg/100g) por bactérias inoculadas em caldo de Níven (NIVEN, JEFREY & CORLETT, 1981) sob diferentes condições de incubação*.

Microrganismo	Produção de histamina (mg/100g)**								
	1 dia			3 dias			6 dias		
	5°C	15°C	30°C	5°C	15°C	30°C	5°C	15°C	30°C
<i>A. hydrophila</i>	nd***	4,0	4,6	nd	4,9	4,10	nd	4,5	6,20
<i>M. morgani</i>	3,1	8,5	107,0	nd	124,0	114,0	3,6	110,0	65,3
<i>P. shigelloides</i>	nd	nd	2,9	nd	nd	17,7	nd	8,40	47,5

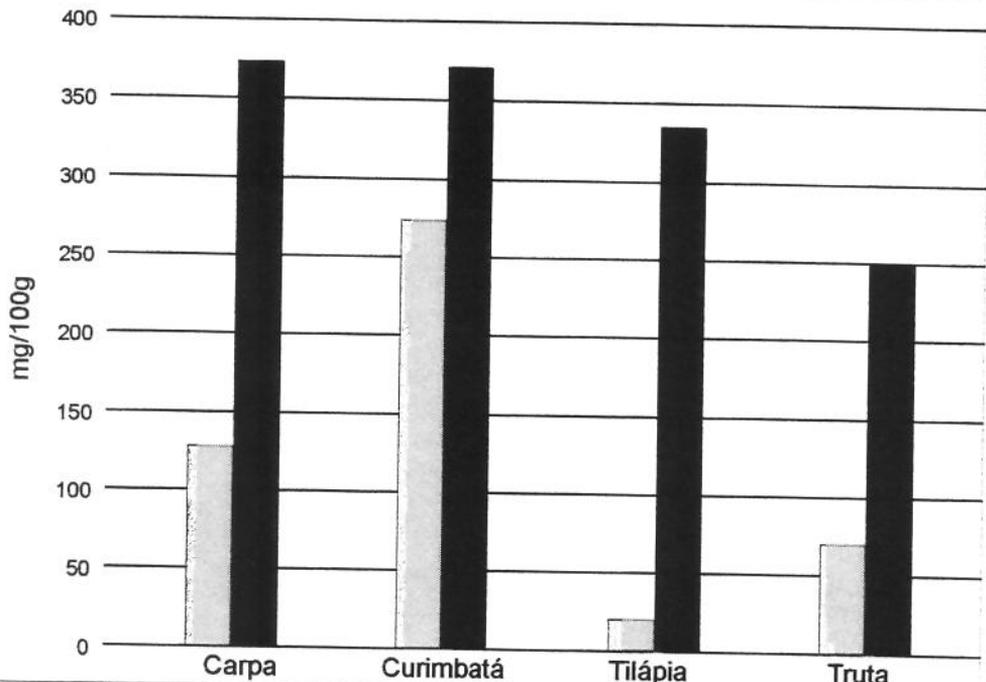
* média de análises em triplicata **mg/100g = miligramas por 100 gramas ***nd = não detectada

Pela análise dos resultados contidos na **Tabela 8**, verificou-se que tanto *A. hydrophila* quanto *P. shigelloides* não demonstraram ter uma intensa capacidade de produção de histamina, sendo que *P. shigelloides* produziu uma quantidade mais acentuada apenas no sexto dia de incubação, a 30°C. Por outro lado, *A. hydrophila* evidenciou produção baixa e praticamente constante a partir do primeiro dia, nas temperaturas de 15°C e 30°C, atingindo seu máximo no sexto dia a 30°C.

A produção de histamina a 5°C foi muito baixa ou nula, comprovando novamente, a importância da refrigeração adequada no controle da produção da amina. Em relação à *M. morganii*, observou-se que a cepa testada apresentou um máximo de produção de histamina a 15°C no terceiro dia de incubação (124mg/100g), demonstrando ser esse binômio tempo/temperatura o ideal para que essa bactéria produza quantidades de histamina acima do nível crítico de 100mg/100g, considerado como potencial para causar uma intoxicação (IENISTEA 1973, TAYLOR, 1985). No sexto dia de incubação esses valores sofreram um pequeno decréscimo, provavelmente devido à ação das histaminases (LEITÃO, 1988, BRANDÃO, 1996). Convém ainda destacar que valores de histamina acima de 100mg/100g foram produzidos por *M. morganii*, a partir do primeiro dia a 30°C (107,0mg/100 mL) e do terceiro dia a 15°C (124,0 mg/100 mL). Quando comparados com dados de outros autores como ARNOLD & BROWN (1978) LEITÃO et al. (1983) e FLETCHER, BREMER & OSBORNE (1999), os resultados obtidos nessa pesquisa são concordantes, no sentido de destacar *M. morganii* como o principal microrganismo produtor de histamina em peixes. Estes resultados também deixam evidente que a produção de histamina atingiu valores mais altos em temperaturas iguais ou superiores a 15°C, confirmando que o armazenamento de pescado em temperaturas de abuso (>15°C), é condição essencial para transformar esse alimento em veículo de intoxicação histamínica. Por outro lado, a refrigeração adequada (temperaturas inferiores ou iguais a 5°C) seria provavelmente a principal barreira para impedir a produção de histamina em níveis potencialmente tóxicos em peixes de origem fluvial ou lacustre.

5.4. Determinação de histidina livre, histamina e aminoácidos livres totais em peixes de origem fluvial ou lacustre

Na figura 5, são apresentados os teores de histamina, histidina e aminoácidos livres totais em amostras de peixes capturados em criadouros do Estado de São Paulo.



	Carpa	Curimbatá	Tilápia	Truta
Histamina	não detectada	não detectada	não detectada	não detectada
Histidina livre	129,24	273,78	20,44	70,19
Aminoácidos livres totais	372,68	370,37	335,11	247,55

FIGURA 5. Teores de histamina, histidina e aminoácidos livres totais em amostras de peixes capturados em criadouros do Estado de São Paulo.

Em todas as amostras de peixe analisadas não foi detectada histamina, embora os níveis de histidina livre tenham sido relativamente elevados, especialmente no curimbatá e carpa conforme **Figura 5**.

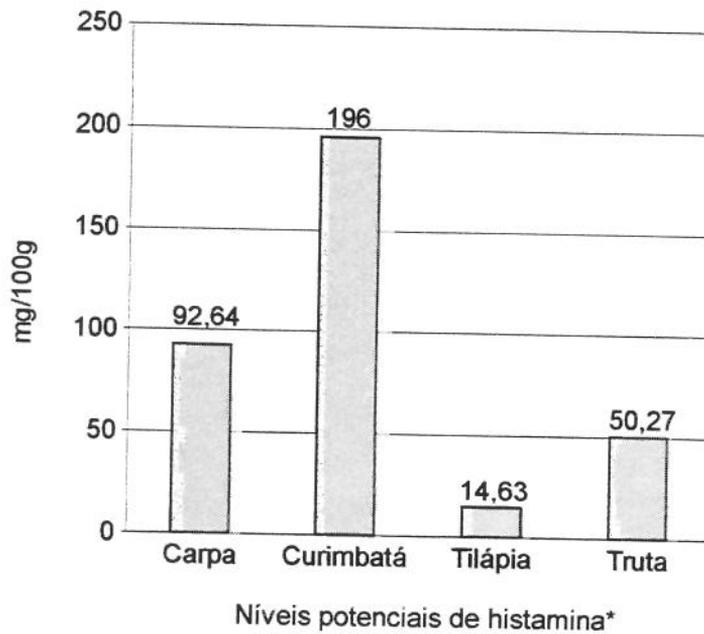
De acordo com LEITÃO, BALDINI & SALLES (1983), não é de se esperar níveis altos de histamina em pescado fresco mantido em baixas temperaturas, independentemente da quantidade de histidina livre detectada, uma vez que as bactérias produtoras de histamina evidenciam atividade de descarboxilação em temperaturas mais elevadas, com um ótimo ao redor de 25°C e intervalo de produção da amina na faixa de 15°C a 35°C. Para garantir a qualidade, é de importância vital que seja mantida a continuidade da cadeia de refrigeração nas várias etapas de produção, que se inicia na captura e estende-se ao produto final. LEITÃO, BALDINI & SALLES (1983).

YOSHINAGA & FRANK (1984) examinando amostras de atum fresco, capturado no Haváí, Estados Unidos da América do Norte, constataram níveis baixíssimos de histamina, com valores máximos de 0,13 mg/100g. Ao mencionarem resultados de outras pesquisas, esses autores afirmaram que mesmo os pescados susceptíveis à formação de histamina, como os escombrídeos, quando frescos e prontamente congelados, são praticamente isentos da amina.

Embora a não-deteção de histamina nos peixes estudados no presente trabalho seja um indicador positivo de boas práticas de armazenamento, não se pode descartar uma eventual possibilidade de manuseio inadequado e comercialização em temperaturas de abuso, situações que possibilitariam a formação de histamina, desde que os mesmos apresentassem níveis elevados de histidina livre.

Ainda com base nos dados da **Figura 5**, observa-se que as espécies curimatá e carpa foram as que continham níveis mais elevados de histidina livre, sendo, portanto, as que apresentariam um maior potencial de formação de histamina.

No processo de formação da histamina, a histidina livre é descarboxilada com produção de amina e gás carbônico. Admitindo-se uma conversão teórica de 100% Segundo LEITÃO, BALDINI & SALES (1983) tem-se que, cada mol de histidina livre (155g) formará 1 mol de histamina (111,5g). Esse cálculo estequiométrico é um mecanismo utilizado para se estimar quantidades potenciais de histamina em alimentos. Assim, com base nos dados contidos na **Figura 4**, seria possível estimar os níveis formados, em condições favoráveis à proliferação da microbiota histamina-positiva. Esses resultados constam da **Figura 6**.



*Valores estequiométricos calculados supondo a conversão de 1 mol de histidina(155g) em 1 mol de histamina (111,5g).

FIGURA 6. Níveis potenciais de histamina passíveis de formação em espécies de peixes de origem fluvial ou lacustre.

Os padrões da Comunidade Econômica Européia, estabelecem limites máximos para histamina, em peixes, de 20 mg/100g. Comparando estes valores com os dados ilustrados na **Figura 6**, constata-se que, à exceção da tilápia, valores acima desses limites poderiam eventualmente ser atingidos, assumindo uma condição precária de armazenamento em temperaturas consideradas de abuso. Esses resultados também levam a concluir que o curimbatá, seguido da carpa e da truta, seriam as espécies de peixe que apresentariam maior risco de serem eventuais veículos de uma intoxicação por histamina, uma vez que os valores de 50mg/100g, e 100 mg/100g, considerados perigosos e extremamente perigosos respectivamente, pela legislação da Comunidade Européia (HUSS, 1993) poderiam ser atingidos em decorrência do armazenamento inadequado. No caso específico da tilápia, essas possibilidades seriam muito remotas, uma vez que mesmo os valores acima de 20mg/100g não seriam atingidos, com base nos níveis de histidina livre detectados.

Por outro lado, relacionando os dados da **Figura 6** com os limites de tolerância citados por IENISTEA (1973) conclui-se que todas as espécies poderiam apresentar níveis potenciais de histamina suficientes para provocar algum distúrbio no consumidor, especialmente naqueles mais sensíveis, uma vez que, teores de histamina superiores a 8mg/100g, já seriam capazes de causar intoxicações leves.

Em conclusão, a adoção de boas práticas de armazenamento, principalmente quanto ao uso de temperaturas de refrigeração adequadas, seria crítica na prevenção da formação de histamina em níveis tóxicos, principalmente em espécies como o curimatá e carpa.

5.5. Histamina em extrato muscular de curimatá inoculado com *Morganella morganii* e correlação com a intensidade de contaminação

Observando-se os dados contidos na **Tabela 9** pode-se constatar que a 5°C não houve desenvolvimento de *M.morganii* inoculada, sendo os valores de histamina obtidos considerados baixos (< 5 mg./100g). No entanto, a 15°C, a população inicial mostrou um incremento de 3 ciclos logarítmicos a partir do terceiro dia (72h), o maior observado no período em estudo, sendo que a produção de histamina também atingiu o maior nível.

TABELA 9. Produção de histamina em extrato muscular estéril de curimatá inoculado com *Morganella morganii*.

Condição de Incubação		Histamina (mg/100g)	Contagem (log UFC/g)*
Tempo (dias)	Temperatura (°C)		
1	5	0,82	4,02
	15	2,06	4,11
	30	53,03	5,04
3	5	3,06	4,16
	15	107,78	7,07
	30	93,01	6,03
6	5	3,34	4,01
	15	107,15	6,98
	30	86,01	6,01

*Logarítimo das Unidades formadoras de colônias por grama de extrato de pescado.

Obs.: Tubos com amostras não-inoculadas (controle), foram mantidos sob as mesmas condições, não sendo detectadas contagens, nem a presença de histamina nos mesmos.

À temperatura de 30°C, a população de bactérias aumentou um ciclo logarítmico em 24 h (dia 1), com a produção de histamina atingindo 53,03mg./100g., o maior valor observado em um intervalo de 24h. No terceiro dia, esse valor chegou próximo a 100mg/100g., tendo um sensível decréscimo no sexto dia de incubação. Esses dados permitem dizer que em 24 h, peixes de origem fluvial ou lacustre, como o curimatá, que apresentam altos teores de histidina livre no músculo e com uma carga microbiana em torno de 10^5 UFC/g. desde que mantidos em temperaturas de abuso, podem ser considerados veículos potenciais de intoxicação histamínica moderada (IENISTEA, 1973). Além disso, estariam fora dos padrões da Comunidade Econômica Européia e do MERCOSUL. A análise da **Tabela 9**, revela ainda que o binômio 15°C/3dias, pode ser considerado como o mais crítico, uma vez que a quantidade de histamina

produzida atingiu valores acima de 100mg/100g, classificando o peixe como “altamente tóxico” quanto à tolerância humana (IENESTEVA, 1973)

O sensível decréscimo de teores de histamina a partir do 6º dia, que foi observado especialmente na temperatura de 30°C, pode ser atribuído a uma eventual produção de histaminases (TAYLOR, 1990).

5.6. Histamina em filés de curimatá em condições naturais, inoculados com *Morganella morganii* e correlação com as contagens microbianas

Os resultados obtidos nesse estudo encontram-se na **Tabela 10**. Observa-se que à temperatura de 5°C os níveis de histamina, tanto nos filés inoculados com *M. morganii*, bem como naqueles não inoculados, (controle) estavam abaixo de 10mg/100g, um nível considerado seguro.

TABELA 10. Produção de histamina em filés de curimatá, em condições naturais, inoculado com *Morganella morganii*.

Condição de Incubação		Histamina (mg/100g)		Contagem de bactérias histamina-positivas (log UFC/g)*	
Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Inoculado	Controle	Inoculado	Controle
1	5	nd***	nd***	4,03	1,04
	15	9,17	3,27	1,89	2,07
	30	68,43	16,35	4,04	2,10
3	5	7,79	9,35	4,16	2,87
	15	59,66	35,08	7,07	3,09
	30	25,80	22,38	5,03	4,07
6	5	2,17	8,87	3,01	2,06
	15	119,38	66,30	8,98	4,67
	30	74,93	24,76	7,01	4,04

*Logaritmo das Unidades formadoras de colônias por grama de filé de curimatá. (Média de duas determinações).

** Controle = Amostra não-inoculada

*** Não detectada.

O valor mais elevado observado nessa temperatura, foi na amostra inoculada, após 3 dias de incubação, 7,79mg/100g. Também a população de bactérias produtoras de histamina, tanto nas amostras inoculadas, como nas controle, foi reduzida, mantendo um valor no nível de 10^3 UFC/g (3 logUFC/g) e 10^2 UFC/g (2 logUFC/g) respectivamente. Esses dados vêm confirmar a eficiência do uso de baixas temperaturas como uma barreira à formação de histamina em pescado.

Na temperatura de 15°C, assim como foi observado anteriormente, no extrato muscular de curimatá, obteve-se a maior produção de histamina, apenas no sexto dia de armazenamento, quando chegou a ultrapassar o valor de 100mg/100g, suficiente para provocar uma intoxicação histamínica (IENISTEA, 1973). A população de bactérias produtoras de histamina aumentou 4 ciclos

logarítmicos nessa temperatura, atingindo também o valor máximo no sexto dia de armazenamento 8,98 logUFC/g. Nas amostras controle (**Tabela 10**), a população variou menos, apenas 2 ciclos logarítmicos, atingindo o máximo também no sexto dia (4,67 logUFC/g).

Na temperatura de 30°C, a microbiota histamina positiva teve um aumento menor, de 3 ciclos logarítmicos, observado no sexto dia na amostra inoculada e de 2 ciclos logarítmicos na amostra controle. A produção de histamina foi menor, comparativamente às amostras mantidas a 15°C; no entanto, no 6° dia de incubação, alcançou níveis de 74,93 mg/100g, já passíveis de restrição no aspecto de saúde pública.

Nas amostras-controle inicialmente não se observou a presença de histamina. A microbiota presente variou de 10^1 UFC/g ou 1 logUFC/g a 10^4 UFC/g ou 4 logUFC/g, sendo observado um incremento dessa população com o aumento do tempo e temperatura de incubação. O máximo valor observado foi no sexto dia, a 15°C, onde se constatou uma população de 4,67 logUFC/g. Observou-se também, nesse mesmo binômio tempo/temperatura, uma quantidade acima das especificações para a histamina, de 66,30mg/100g, sendo este o maior valor detectado nas amostras não-inoculadas e produzido pela microbiota naturalmente presente na amostra.

Com base nos dados obtidos, considerando-se períodos mínimos de manutenção em condições de abuso (temperatura/tempo inadequados) e níveis de produção de histamina acima dos limites da legislação, pode-se afirmar que os binômios 15°C / 72 horas e 30°C /24 horas seriam particularmente críticos. O problema se agrava quando se reconhece que as condições de manutenção do pescado pós captura e durante seu armazenamento, transporte e comercialização, nem sempre são as corretas no contexto das boas práticas, possibilitando, assim, que estas situações venham efetivamente a ocorrer.

Outro aspecto interessante a destacar é que, pela análise da **Figura 6** e das **Tabelas 9 e 10** é possível comparar-se dados da conversão teórica de histidina livre em histamina com os observados experimentalmente. Assim,

restringindo-se ao curimatá, que evidenciou os maiores níveis de histidina livre, constatou-se conversão máxima de 54% em extrato muscular (15°C/3dias) e de 60% em filés inoculados (15°C/6dias), valores que podem ser considerados relativamente elevados.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem que se alcancem as seguintes conclusões:

- Independentemente do local de criação, espécie de peixe e época de amostragem, os resultados obtidos revelaram a presença reduzida de microbiota histamina-positiva na superfície dos peixes de cultivo fluvial ou lacustre, predominando espécies das famílias *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*.
- A exemplo do relatado para o pescado de origem marinha (de regiões temperadas ou tropicais) também *Morganella morganii* foi a bactéria isolada com um maior potencial de produção de histamina, tanto em meios de cultura, como em extrato muscular ou filés de peixes de água doce.
- Quanto à capacidade de descarboxilação "in vitro" de aminoácidos precursores de outras aminas biogênicas, a cultura de *Morganella morganii* selecionada entre as bactérias isoladas da superfície de peixes mostrou um potencial maior em relação às demais espécies estudadas.
- A presença de histamina não foi positivada no tecido muscular de nenhuma das amostras de peixes analisadas imediatamente após a captura, indicando que o risco de acúmulo desta amina provavelmente seria conseqüência de práticas inadequadas de manuseio e conservação pós captura.
- A presença de histidina livre, precursora da histamina, foi detectada em níveis elevados no tecido muscular de curimatá, seguido da carpa e em níveis reduzidos na truta e tilápia.
- Valores acima de 100mg/100g, podem ser atingidos em tecido muscular de curimatá e carpa se armazenadas em temperaturas de abuso (15°C).
- Populações nos níveis de 7 logUFC/g (ou 10⁷UFC/g) e de 4 logUFC/g (ou 10⁴ UFC/g) em filés de curimatá, em condições naturais, inoculados com bactérias histamina positivas, foram suficientes para produzir histamina em

níveis considerados tóxicos pelos padrões da FDA ($>50\text{mg}/100\text{g}$), nos binômios $15^\circ\text{C}/3\text{dias}$ e $30^\circ\text{C}/1\text{ dia}$, respectivamente.

- Com base em testes de inoculação de culturas histamina positivas em meio de cultura e em extrato muscular de peixes, mantidos em diferentes condições de temperatura e tempo de incubação, constatou-se a ausência de produção da amina a 5°C e a atividade crescente em temperaturas acima de 15°C , confirmando assim que a refrigeração é um obstáculo efetivo no controle da multiplicação de bactérias histamina-positivas em peixes cultivados em pesqueiro.
- Testes de inoculação de bactérias histamina-positivas em filés de curimatá mantidos em diferentes condições tempo/temperatura, comprovaram que a refrigeração adequada (5°C) por um período de até 6 dias, foi eficiente na prevenção da formação de histamina, sendo esta, provavelmente, a melhor e mais efetiva barreira no controle da potencial intoxicação histamínica veiculada por peixes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUC, L. Histamine food poisoning: an update. **Fish Technology News**, v.1, n.11, p.3-5, 1991.
- ACTIS, L. A. et al. Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v.39, n.1, p.79-90, 1999.
- ANONYMOUS. Rapid tests for seafood quality: histamine detection. **Food Australia**, Brisbane, v.51 n.3, p. 102, 1999.
- AOAC. Histamine in seafood: fluorometric method. Method 35.1.32, method 977.13. In CUNNIF, P.A. (Ed.), **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th Edition. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, Gaithersburg, MD, p.16-17, 1995.
- ARNOLD, S. H.; BROWN, D. Histamine toxicity from fish products. **Advances in Food Research**, New York, v.24, p.114-154, 1978.
- ASCIONE, A. et al. Two cases of scombroid syndrome with severe cardiovascular compromise. **Cardiologia**, Basel, v. 42, n.2, p.1285-1288, 1997.
- BALDINI, V. L. S. Aminas biogênicas e a deterioração do pescado. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, p.389-402, 1982.
- BARANOWSKI, J. D. M. A. et al. Decomposition and histamine content in mahimahi (*Coryphaena hippurus*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.53, p.217-222, 1990.

- BARDOCZ, S. et al. Polyamines in food implication for growth and health. **Journal of Nutritional and Biochemistry**, Stoneham, Mass., v.14, p.66-71, 1993.
- BARTHOLOMEW, B. A. et al. Scombrototoxic fish poisoning in Britain: features over 250 suspected incidents from 1976 to 1986. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.99, p.775-782, 1987.
- BARTRAM, P. K. Proper shipboard handling of fresh tuna for the sashimi market. In: MARTIN, R. E.; COLLETTE, R. L.; SLAVIN, J. W. (Eds.). **Fish Inspection: quality control and HACCP, a global focus**. Proceedings of the Conference held 19-24 May, 1996, Arlington, V.A. Lancaster, Basel: Technomic, 1997. p.448-457.
- BERAQUET, N. J.; LINDO, M. M. K. Transformações bioquímicas "post mortem" em pescado. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.2, p.169-192, 1985.
- BOVER-CID, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, n.3, p.367-373, 2001.
- BRANDÃO, L. G. B. **Potencial de formação de aminas biogênicas em peixes de piscicultura**, 1996. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CATTANEO, P.; CANTONI, C. Identificazione e dosaggio rapido dell istamina nelle carni di pesce. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.17, p. 303-307, 1978.

- CHEN, C. M. et al. Comparison of four agar media for detection of histamine producing bacteria in tuna. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.11, p.808-813, 1989.
- CHU, C. H.; BJELDANES, L. F. Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, p.79-88, 1981.
- CLARK, R. B. Scombroid poisoning revisited (Letter). **Annual Emergency Medicine**, v.29, n.3, p.426-427, 1997.
- CLIFFORD, M. N. et al. Studies with volunteers on the role of histamine in suspected scombrototoxicosis. **Journal of Science and Food Agricultural**, London, v.47, n.3, p.365-375, 1989.
- CRAPO, C.; HIMELBLOOM, B. Spoilage and histamine in whole pacific herring (*Clupea harengus pallasii*) and pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets. **Journal of Food Safety**, Connecticut, v.19, p.45-55, 1999.
- DIPOA. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Portaria nº 185 de 13 de maio de 1997**. <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/Portaria185.htm>
- EDMUNDS, W. J.; EITENMILLER, R. R. Effect of storage time and temperature on histamine content and histamine content and histamine decarboxilase activity of aquatic species. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, p.516-519, 1975.
- EITENMILLER, R. R.; ORR, J. H.; WALLISI, J. W. Histamine formation in fish: microbiological and biochemical conditions. **Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products**, v.4, p.39-49, 1978.

- FLETCHER, G. C.; BREMER, P. J.; OSBORNE, C. M. Controlling bacterial histamine production in hot-smoked fish. In: TUIJTELAARS, A. C. J. et al.(Eds.). **Food Microbiology and Food Safety Into the next Millenium**. The Netherland: Veldhoven, 1999. p.168-179.
- FOO, L.Y. Simple and rapid paper chromatographic method for the simultaneous determination of histidine and histamine in fish samples. **Journal of AOAC**, Washington, DC., v.60, p.183-185, 1975.
- FRÉBORT, I.; SKOUPA, L.; PEC, P. Amine oxidase-based flow biosensor for the assessment of fish freshness. **Food Control**, Oxford, v.11, n.1, p.13-18, 2000.
- FUNG, D. **Rapids Methods and Automation in Microbiology**: apostila de curso. São Paulo: USP, 1992. 182p.
- GENNARI, M.; TOMASELLI, S.; COTRONA, V. The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. **Food Microbiology**, v.16,n.1, p. 15-28, 1999.
- HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Technology**, Cambridge, v.5, p.42-49, 1994.
- HARVIMA, R.J.; TUOMISTO, L.; HUSMAN, T. Repeated hand urticaria due to contact with fishfood. Scandinavian. **Journal of Work Environmental and Health**, Helsinki, v. 25, n. 2, p. 151-152, 1999.
- HUSS, H. H. **Assurance of Seafood Quality**. Denmark: Technical University Lyngby, 1993. 169p.
- ICMSF. **Microorganisms in foods**. 3rd.ed. Toronto: University of Toronto Press, 1996.

- IENISTEA, C. Significance and detection of histamine in food. In: HOBBS, B. C.; CHRISTIAN, J. H. B. (Eds.). **The Microbiological Safety of Foods**. London: Academic Press, 1973. p.327-343.
- IZQUIERDO-PULIDO, M. et al. Biogenic amines changes related to lactic acid bacteria during brewing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.2, p.175-180, 1996.
- KIM, S. H.; AN, H.; PRICE, R. J. Histamine formation and bacterial spoilage of albacore harvested off the US Northwest coast. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, p.340-343, 1999.
- KIM, S. H. et al. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. **Journal of Food Protection**, Ames, v.63, n.2, p.244-251, 2000.
- KIM, S. H. et al. Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in pacific mackarel during storage. **Journal of Food Protection**, Ames, v.64, n.10, p.1556-1653, 2001.
- KIMATA, M. The histamine problem. In: BORGSTRON, G. (Ed.). **Fish as a food: production, biochemistry, and microbiology**. New York: Academic Press, 1961. v.1, p.329-352.
- KIROV, S.M. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Eds.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2ed. Washington, D.C.; USA: ASM Press, 1997. p. 265-287.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. L. (Eds.). **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1984. v.1.

- LANGE, W. R. Scombroid poisoning. **American Family Physician**, v.37, p.163-168, 1998.
- LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, Brisbane, v. 58, n.1, p.37, 2000.
- LEITÃO, M. F. F. Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. In: **SEMINARIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDUSTRIA DE PESCADO**, Santos, 25-27 julho 1988. Santos: Leopoldianum, 1988. p.40-58.
- LEITÃO, M. F. F.; BALDINI, V. L. S.; SALES, A. M. Histamina em pescado e alimentos industrializados. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.13, p.123-130, 1983
- LEITÃO, M. F. F.; SILVEIRA, N. F. A. Influência da temperatura ambiental na natureza e potencial deteriorador da microbiota bacteriana de peixes em ambientes lacustres tropicais. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.23, n.1 p.85-97, 1993.
- LEITÃO, M. F. F.; SILVEIRA, N. F. A.; BALDINI, V. L. S. Histamina em queijos tipo minas padrão e prato. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.25, n.2, p.173-179, 1995.
- LEUNG, E. **Amine producing bacteria isolated from club mackerel (*Rastrelliger sp*)**. A thesis in partial fulfillment of the requirements for the degree of bachelor of agricultural science with honours. University of Tasmania, Hobart, Australia, 1987.

- LEUSCHNER, R. G. K.; HAMMES, W. P. Degradation of histamine and tyramine by *brevibacterium linens* during surface reopening of munster cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.7, p.874-878, 1998.
- LIPP, E. K.; ROSE, J. B. The role of seafood in foodborn diseases in the United States of America. **Review of Science and Technology**, v.16, n.2, p.620-640, 1997.
- LISTON, J. Microbiology in fishery sciences. In: CONNELL, J. J. (Eds.). **Advances in fish science and technology**. Survey: Fishing News Books, 1990. p.138-157.
- LORCA, T. A. et al. Growth and histamine formation of *Morganella morganii* in determining the safety and quality of inoculated and uninoculated bluefish (*Pomatus saltatrix*). **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.4, n. 12, p-2015-2019, 2001.
- LUTEN, J. B. et al. Biogenic amines in fishery products: standardization methods within EC. In: HUSS, H.; JAKOBSEN, M.; LISTON, J.(Eds.). **Quality assurance in the fish Industry**: Proceedings of International Conference, Copenhagen, Denmark, 26-30 AUGUST 1991. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 427-439.
- MACAN, J. V. A. et al. Occupational histamine poisoning by fish flour: a case report. **Occupacional Medicine**, Oxford, v.50, n.1, p. 21-24, 2000.
- MAGA, J. A. Amine in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.10, p.373-403, 1978.
- MAVROMATICS, P; QUANTICK, P.C.Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters

- associated with its use. **Journal of Food Protection**, v.65, n.3, p.546-551, 2002.
- MAZZUCO, H. **Impacto das aminas biogênicas na produção avícola**: instrução técnica para o avicultor. Brasília: EMBRAPA Suínos e Aves; Ministério da Agricultura, 1997.
- MERSON, M. H. et al. Scombroid fish poisoning: outbreak traced to commercially canned tuna fish. **Journal of American Medicine Association**, v. 228, n.10, p. 1286-1269, 1974.
- MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, p.155-158, 1977.
- MITCHEL, J. W. **Scombrototoxic fish poisoning**: a report prepared for the ministry of healthy, Institute of Environmental Health and Forensic Sciences Limited. Luckland: Mt.Albert Science Centre, 1993.
- NANDON, C. A.; ISMOND, M. A. H.; HOLLEY, R. Biogenic amines in vacuum: packaged and carbon-dioxide controlled atmosphere-packaged fresh pork stored at -1.5°C . **Journal of Food Protection**, Aimes, v.64, n.2, p.220-227, 2001.
- NÍVEN, C. F. Jr.; JEFFREY, M. B.; CORLETT, D. A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine production bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v.41, p.321-322, 1981.
- OKUZUMI, M., YAMANAKA, H., KUBOZUKA, T. O currence of various histamine-forming bacteria on/in fresh fishes. **Bulletin of Japanese Society Scientific Fishery**, Tokyo, v.50(1), p.161-167, 1984.

- OLIVEIRA, C. P. et al. Nitrate, nitrite and volatile nitrosamines in whey-containing food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.43, p.967-969, 1995.
- PARROT, J. ; NICOT, G. Pharmacology of histamine. In: Eichler, O.; Farah, S. (Eds.). **Handbook of experimental pharmacology**. New York: Springer Verlag, 1966. p.148-161.
- PRICE, R.J., 1999. **Compendium of Fish and Fishery Product processes, hazards and Controls**. National Seafood HACCP Alliance for training and education.9 <http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/comped.htm>, updated, 8/9/99.
- RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; MORA-VENTURA, M.T.; CIVERA, T. Istamina e prodotti ittici: um problema attuale -parte I, fattori implicati. **Industrie Alimentari**, Torino, v.33, p.299-307, 1994.
- SAPIN-JALOUSTRE, H.; SAPIN-JALOUSTRE, J. A little known food poisoning: histamine poisoning from tuna. **Concours Medical**, Paris, v.79, p.2705-2708, 1957.
- SASSAKI, L. A.; RIBEIRO, P. Intoxicação histamínica por pescado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.5, n.18, p.20-23, 1991.
- SATTLER, J. Food induced histaminosis. In: **REPORT of WHO Consultations on public health aspects of seafood-born zoonotic diseases**. WHO/CDC/PH/90, 1986. p. 59-61.
- SERRAR, D. The development of monoclonal antibody based ELISA for the determination of histamine in food application to the fishery products and

- comparision with HPLC assay. **Food Chemistry**, Long Aston, v.54, p.85-91, 1995.
- SHALABY, A. R. Separation, identification and estimation of biogenic amines in food by thin-layer chromatography. **Food Chemistry**, Long Aston, v.49, p.305-310, 1994.
- SMITH,T.A. Amines in food. **Food Chemistry**, Long Aston, v.6, p.169-200, 1981.
- SOARES, V. F. M.; GLORIA, M. B. A. Histamine levels in canned fish available in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, Orlando, v.7, p.102-109, 1994.
- STRATTON, J. E.; HUKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and others fermented foods: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, p.460-470, 1991.
- TAVARES, M. Legislação em alimentos. **Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos-SBCTA**, São Paulo, v. 7, n.2, 1997.
- TAYLOR, S. L.; LIEBER. E. R. ; LEATHERWOOD, M. A survey of histamine levels in commercially processed scombroid fish products. **Journal of Food Quality**, Westport, v.1, p.393-397, 1978.
- TAYLOR, S. L. **Histamine poisoning associated with fish, cheese and others foods**. Geneva: World Health Organization, 1985. 47p.
- TAYLOR, S. L. Histamine food-poisoning: toxicology and clinical aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, v.17, n.2, p.91, 1986.

- TAYLOR, S.L.; SUMNER,S.S. Determination of histamine, putrescine and cadaverine. In: Kramer, D.E., Liston, J. (Eds.), **Seafood Quality Determination**, Elsevier, Amsterdam, p.235-245, 1986
- TAYLOR, S. L. Histamine intoxication. In: CLIVER, D. O.(Ed.). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. p.164-168.
- TODD, E. C. Seafood associated diseases and control in Canada. **Revision of Science and Technology**, v.16, n.2, p.661-672, 1997.
- VECIANA-NOGUES, M.T.et al. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products products. **Journal of Association of Analytical Chemists International**, Arlington, v.78, n.4, p.1-6, 1995.
- WEI,C. I. et al. Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.1, p.59-63, 1990.
- YAMANII, M. I.; UNTERMANN, F. Development of a histidine decarboxylase medium and its application to detect other aminoacid decarboxylases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2, p.273-278, 1985.
- YOSHINAGA, D. H.; FRANK, H. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, p.447-452, 1982.
- ZEE, J. A. et al. Effect of *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces uvarum* and grist composition on amine formation in beers. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, v.14, n.4, p.321-325, 1981.