

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

DANILO TORRES CARDOSO

**AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA FRENTE À INDICADORES
DE QUALIDADE HIGIÊNICO SANITÁRIA EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA CIDADE
DE SÃO LUÍS – MA**

SÃO LUÍS

2024

DANILO TORRES CARDOSO

AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA FRENTE À INDICADORES DE QUALIDADE HIGIÊNICO SANITÁRIA EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO LUIS – MA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção de título de Mestre em Saúde e Ambiente

Área de Concentração: Saúde e Ambiente

Linha de Pesquisa: Qualidade ambiental e sustentabilidade

Orientador: Prof. Dr.(a) Adenilde Nascimento Mouchrek

Co-orientador: Prof. Dr.(a) Amanda Mara Tele

SÃO LUÍS

2024

Cardoso, Danilo Torres.

Avaliação de Bactérias Produtoras de Histamina Frente À Indicadores de Qualidade Higiênico Sanitária Em Peixes Comercializados Na Cidade de São Luis Ma / Danilo Torres Cardoso. - 2024.

58 f.

Coorientador(a) 1: Amanda Mara Teles.

Orientador(a): Adenilde Nascimento Mouchrek.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2024.

1. Intoxicação Histamínica. 2. Enterobacteriaceae. 3. Deterioração. 4. . 5. . I. Mouchrek, Adenilde Nascimento. II. Teles, Amanda Mara. III. Título.

DANILO TORRES CARDOSO

AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA FRENTE À INDICADORES DE QUALIDADE HIGIÊNICO SANITÁRIA EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO LUIS – MA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção de título de Mestre em Saúde e Ambiente

Área de Concentração: Saúde e Ambiente

Linha de Pesquisa: Qualidade ambiental e sustentabilidade

Aprovado em 23/01/2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Adenilde Nascimento Mouchrek - Orientadora
Doutora em Ciência dos Alimentos Universidade
Federal do Maranhão

Prof. Dr. Leonardo Silva Soares – Avaliador Interno
Doutor em Desenvolvimento e Meio Ambiente
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Josilene Lima Serra – Avaliadora Externa
Doutora em Biotecnologia
Instituto Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Lorena Carvalho Martiniano de Azevedo – Avaliadora Externa ao Programa
Doutora em Química
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por estar sempre presente em minha vida e por me haver dado saúde e energia para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha formação;

Aos meus pais, Antônio Conceição Cardoso e Joana Batista Martins Torres Cardoso por todo o amor, incentivo e apoio incondicional estando sempre ao meu lado. Por acreditarem em mim de uma forma que eu nem consigo descrever, sendo este trabalho dedicado especialmente a eles;

A minha orientadora Adenilde Nascimento Mouchrek e coorientadora Amanda Mara Teles por aceitarem mais uma vez contribuir comigo nessa jornada, pela confiança e por todos os valiosos ensinamentos fundamentais para o meu crescimento profissional. Obrigado por sempre acreditarem no meu potencial;

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na minha jornada.

RESUMO

A preocupação com a qualidade do pescado sempre foi um tema recorrente, visto tratar-se de um alimento de alto valor nutritivo, porém com grande facilidade de deterioração levando perigo ao homem. Os cuidados com esse tipo de alimento nem sempre atendem as condições higiênicas-sanitárias adequadas, o que acaba viabilizando a multiplicação de microrganismos formadores de histamina, uma toxina gerada através da descarboxilação do aminoácido L-histidina que quando em níveis inadequados pode gerar preocupação para a saúde pública, resultando em surtos de intoxicação alimentar podendo levar a óbitos. Por isso, o trabalho propõe avaliar a presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários e bactérias produtoras de histamina em peixes comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís – MA. Foram adquiridas um total de 80 amostras de peixes das espécies *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa*, *Pomatomus saltatrix* e *Sardinella brasiliensis* nos principais pontos de comércio de peixe da cidade de São Luís-MA. Para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* sp. foi seguido a metodologia conforme o APHA. Na contagem de bactérias mesófilas, psicrófilas e produtoras de histamina foi utilizado a técnica de plaqueamento em profundidade em meio Niven, e para identificação das bactérias produtoras de histamina foi utilizado o Kit Bactray I e II. Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que as amostras de peixes Serra, Timbira e Anchova apresentam-se próprias para consumo quanto a padrões de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., enquanto 20% das amostras de Sardinha encontram-se fora do padrão estabelecido pela legislação vigente brasileira. Além disso, foi constatado a presença de bactérias produtoras de histamina em sua maior parcela sendo da família *Enterobacteriaceae* no peixe Serra, o que pode comprometer a qualidade e segurança desse pescado, pois a possível presença da toxina produzida por essas bactérias pode ocasionar risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Intoxicação histamínica. *Enterobacteriaceae*. Deterioração.

ABSTRACT

Concern about the quality of fish has always been a recurring theme, as it is a food with high nutritional value, but with great ease of deterioration, posing a danger to humans. Care with this type of food does not always meet adequate hygienic-sanitary conditions, which ends up enabling the multiplication of microorganisms that form histamine, a toxin generated through the decarboxylation of the amino acid L-histidine which, when at inadequate levels, can cause concern for health. public health, resulting in outbreaks of food poisoning that can lead to deaths. Therefore, the work proposes to evaluate the presence of hygienic-sanitary indicator microorganisms and histamine-producing bacteria in fish sold at fairs and supermarkets in the city of São Luís – MA. A total of 80 fish samples of the species *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa*, *Pomatomus saltatrix* and *Sardinella brasiliensis* were acquired at the main fish trading points in the city of São Luís-MA. To count coagulase-positive *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and search for *Salmonella* sp. The methodology according to APHA was followed. To count mesophilic, psychrophilic and histamine-producing bacteria, the deep plating technique in Niven medium was used, and to identify histamine-producing bacteria, the BacTray I and II Kit was used. The results obtained in the present study allow us to conclude that the Serra, Timbira and Anchova fish samples are suitable for consumption in terms of coagulase-positive *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. standards, while 20% of the Sardine samples are found outside the standard established by current Brazilian legislation. Furthermore, the majority of histamine-producing bacteria were found to be from the *Enterobacteriaceae* family in Serra fish, which could compromise the quality and safety of this fish, as the possible presence of the toxin produced by these bacteria could pose a health risk of the consumer.

Key-words: Histamine Intoxication. *Enterobacteriaceae*. Deterioration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Peixe Serra (<i>Scomberomorus brasiliensis</i>).....	11
Figura 2. Peixe Timbiro (<i>Oligoplites palometa</i>).....	12
Figura 3. Anchova (<i>Pomatomus saltatrix</i>).....	13
Figura 4. Sardinha (<i>Sardinella brasiliensis</i> , Steindachner, 1879).....	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva e negativa em peixes comercializados de São Luís – MA.....	33
Tabela 2 – Percentual da presença de <i>Salmonella</i> sp. de peixes comercializados em São Luís - MA.....	35
Tabela 3 – Percentual da presença de <i>E. coli</i> de peixes comercializados em São Luís - MA	37
Tabela 4 - Contagem de bactérias mesófilas e psicrófilas totais de peixes comercializados em São Luís – MA.....	39
Tabela 5 - Contagem de bactérias mesófilas e psicrófilas produtoras de histamina em peixes comercializados em São Luís – MA.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pH	Potencial Hidrogeniônico
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
IGFS	International Game Fish Association
EPEC	Enteropatogênica
ETEC	Enteroxigênica
EIEC	Enteroinvasiva
EHEC	Enterohemorrágica
EAggEE	Enteroagregativa
DAEC	Difuso-Aderente
MRSA	Meticilina
VRSA	Vancomicina
PCQA	Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
NaCl	Cloreto de Sódio
APHA	American Public Health Association
NMP	Número Mais Provável
BP	Baird-Parker
UFC	Unidade Formadora de Colônia
LST	Lauril Sulfato Triptose
EMB	Eosina Azul de Metileno
IN	Instrução Normativa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
N	Número
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
PCR	Polymerase Chain Reaction
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ETA's	Enfermidades Transmitidas por Alimentos
DTA'S	Doenças Transmitidas por Alimentos
A	Ausência
ICMSF	International Commission Microbiological Specification for Foods

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Peixe Serra (<i>Scomberomorus brasiliensis</i>)	11
2.2 Timbira (<i>Oligoplites palometa</i>)	12
2.3 Anchova (<i>Pomatomus saltatrix</i>)	12
2.4 Sardinha (<i>Sardinella brasiliensis</i>, Steindachner, 1879)	13
2.5 Aspecto de Qualidade do Pescado	14
2.6 Patógenos e Indicadores de Condições Higiênico-Sanitários	15
2.7 Histamina em Pescado	17
2.8 Pesquisa de histamina em pescado no Brasil	18
REFERÊNCIAS	20
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50

CAPÍTULO II

1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Tipo de estudo	29
2.2 Área de estudo	29
2.2 Análises microbiológicas	30
2.2.1 Preparo de diluições seriadas.....	30
2.2.2 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	30
2.2.3 Pesquisa e identificação de <i>Salmonella</i> sp.	30
2.2.4 Contagem e identificação de <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.5 Contagem de bactérias mesófilas, psicrófilas e produtoras de histamina no meio agar Niven	31
2.2.6 Identificação bioquímica das bactérias produtoras de histamina no sistema Bactray I e II	32
2.3 Análise Estatística	32
3 RESULTADO E DISCUSSÃO	32

3.1 Microrganismos indicadores higiênico-sanitários.....	32
3.1.1 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	32
3.1.2 <i>Salmonella</i> sp	35
3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	37
3.2 Microrganismos indicadores do tempo útil de conservação.....	38
3.3.1 Microrganismos mesófilos e psicrófilos totais	38
3.3.2 Microrganismos mesófilos e psicrófilos produtores de histamina	40
3.3.3 Identificação de bactérias produtoras de histamina	41
4 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO A – MODELO DA REVISTA CIÊNCIA E NATURA	51

1. INTRODUÇÃO

No Maranhão, a pesca é caracterizada como artesanal e tem finalidade comercial. Esta pesca artesanal utiliza embarcações de pequeno e médio porte, com propulsão motorizada ou não. Os insumos e petrechos utilizados também são altamente artesanais, sendo adquiridos, em sua maioria, no comércio local (Silva *et al.*, 2016).

O termo pescado designa todo alimento que pode ser retirado de águas oceânicas ou interiores (doces ou salobras) e possa servir para alimentar o homem ou os animais. É um termo genérico, envolvendo peixes, crustáceos, moluscos, quelônios e algas. Entende-se por pescados frescos, o produto obtido de espécies saudáveis e de qualidade adequada ao consumo humano, convenientemente lavado e seja conservado somente pelo resfriamento a uma temperatura próxima a do ponto de fusão do gelo (MAPA, 2017).

Apesar da elevada importância nutricional, o pescado é o alimento de origem animal com maior probabilidade de deterioração, principalmente por apresentar pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos, acentuado teor de fosfolipídios e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e nas vísceras do peixe, gerando grande preocupação quanto a sua qualidade (Gonçalves, 2011).

Um produto decorrente da deterioração do pescado é a histamina, uma diamina biogênica primária e heterocíclica, não volátil e termoestável formada na descarboxilação bacteriana do aminoácido L-histidina quando as condições de manuseio e estocagem são inadequadas, favorecendo a multiplicação de microrganismos que favorecem sua atividade (Moreira, 2018).

As bactérias produtoras desta enzima são Gram-negativas, mesófilas e psicotróficas da família *Enterobacteriaceae* e estão comumente presentes em ambientes aquáticos. O perigo da histamina em pescado é intensificado pela sua característica de não volatilidade, podendo conferir toxicidade ao produto mesmo antes deste ser considerado deteriorado ou sensorialmente inaceitável (Carmo *et al.*, 2010).

De acordo com a espécie do pescado pode haver mudanças na concentração de histamina, quanto maior for a concentração de histidina livre existente nelas maior será a formação dessa toxina (Huss, 1997). A Portaria nº 185 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) diz que se entende por espécies formadoras de histamina as pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombrosocidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae* (Brasil, 1997). Essas espécies podem vir a formar um nível

maior do que 100 ppm de histamina na musculatura, sendo que o nível mínimo para causar sintomas de intoxicação é de 100 ppm (Jay, 2005).

A comercialização dos pescados ocorre em vias públicas, feiras e supermercados, portanto é de fundamental importância avaliar as condições higiênicas sanitárias através de análises microbiológicas tomando por base, parâmetros e limites recomendados pela RDC n° 724, de 1ª Julho de 2022 e Instrução Normativa n° 161 que estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos.

Diante disso, este trabalho propõe realizar uma avaliação microbiológica de interesse nas bactérias indicadoras higiênico-sanitária e formadoras de histamina em peixes das espécies Serra (*Scomberomorus brasiliensis*), Timbira (*Oligoplites palometa*), Anchova (*Pomatomus saltatrix*) e Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís – MA para que se tenha respostas quanto à qualidade desse alimento oferecido aos consumidores.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Peixe Serra (*Scomberomorus brasiliensis*)

Scomberomorus brasiliensis, popularmente conhecido como peixe Serra, é um pescado que apresenta uma coloração verde azulada na região do dorso, com a região medial inferior branca prateada, região dos flancos possuindo manchas arredondadas e com cores de amarelo e dourado, possui ainda na região anterior do dorso, morfologia espinhosa negra, com linha lateral com forma gradual de declive e sem curva grosseira (Espírito Santo *et al.*, 2005), como pode ser observado na figura 1.

Figura 1. Peixe Serra (*Scomberomorus brasiliensis*)



Fonte: Autor, 2023.

Alimenta-se principalmente de peixes, com quantidades menores de camarões peneídeos e cefalópodes loliginídeos. A maior parte da pesca é consumida fresca, mas no Brasil parte é salgada e parte enlatada. Também utilizado defumado e congelado, usado para ceviche (Frimodt, 1995).

Em alguns estudos é possível encontrar a variação em que essa espécie tem com relação a quantidade de alimento consumido, tendo entre os meses de junho a setembro, as épocas de maior consumo alimentar (Batista, 2001).

A capacidade de desenvolvimento desse tipo de pescado muda de acordo com as variações sazonais do ambiente, como por exemplo, estruturas, tamanho, cores, período de reprodução e alimentação, sendo estes correlacionados ao seu desenvolvimento (Da Silva; De Castro; Gubiani, 2005).

2.2 Timbira (*Oligoplites palometa*)

Oligoplites palometa, popularmente conhecido como Timbira, é um pescado que pode ser encontrado em água doce e marinha, também sobre fundos lamacentos de águas costeiras (Fischer, 1984).

As espinhas dorsais e anais possuem glândulas venenosas (Cervigón *et al.*, 1992). Os adultos são carnívoros, enquanto os juvenis de até 8,2 cm se alimentam principalmente de escamas retiradas de peixes maiores, também de crustáceos bentônicos e planctônicos e, em menor extensão, de peixes menores e poliquetas (Bussing, 1998; Sazima & Uieda, 1979).

Juvenis de até 3,0 cm adotam um padrão de cor marrom escuro enquanto estão próximos a fragmentos de plantas em decomposição, um exemplo de camuflagem (Sazima & Uieda, 1979; Sazima, 2002).

Sobre fundo arenoso aberto, livre de detritos e de cor clara, adota um padrão contrastante entre o amarelado e o marrom escuro, exemplo de cores de alerta (Sazima, 2002), como pode ser observado na figura 2.

Figura 2. Peixe Timbira (*Oligoplites palometa*)



Fonte: Autor, 2023.

2.3 Anchova (*Pomatomus saltatrix*)

Pomatomus saltatrix, conhecido como peixe Anchova pode ser encontrado em águas oceânicas e costeiras. Eles são mais comuns ao longo de praias de surf e promontórios rochosos

em águas limpas e de alta energia, embora os adultos também possam ser encontrados em estuários e em águas salobras (Claro, 1994; Grant, 1992).

Os peixes pequenos podem ser encontrados em águas costeiras rasas com pelo menos 2m de profundidade, em cardumes que perseguem e atacam peixes pequenos (May, 1986; Cervigón, 1993). Já os adultos estão em grupos soltos, atacando frequentemente cardumes de tainhas ou outros peixes e destruindo números aparentemente muito superiores às necessidades de alimentação (Collette, 1996).

Pode atingir um comprimento máximo de 130 cm, e peso máximo de 14,4 kg, com uma idade máxima já encontrada de 14 anos (Randall, 1995; IGFS, 1991; Schilling *et al.*, 2023), a ilustração do peixe Anchova pode ser observado na figura 3.

Figura 3. Anchova (*Pomatomus saltatrix*)



Fonte: Autor, 2023.

2.4 Sardinha (*Sardinella brasiliensis*, Steindachner, 1879)

Sardinella brasiliensis, mais conhecida com Sardinha, pode ser encontrada em águas costeiras, formando frequentemente cardumes compactos (Gigliotti *et al.*, 2010).

Possuem um comprimento máximo de 27,0 cm, com características diagnósticas de *Sardinella aurita*, das quais difere por ter os rastros branquiais anteriores nos membros inferiores do segundo e terceiro arcos branquiais distintamente curvados para baixo (mais ou menos planos em *S. aurita*) (Trindade-Santos & Freire, 2015; Whitehead, 1985).

A contagem de raios da nadadeira pélvica distingue *S. brasiliensis* de todas as outras espécies de *Sardinella* (Whitehead, 1985). Semelhante a *Sardinella aurita*, preto azulado acima, peritônio preto. A separação de *Sardinella brasiliensis* de *S. aurita* com base no formato do rastro branquial e em uma contagem mais alta de rastros branquiais é provisória (Smith, 1997; Bigelow, 1963).

Na figura 4 pode ser observado a descrição da Sardinha (*Sardinella brasiliensis*, Steindachner, 1879).

Figura 4. Sardinha (*Sardinella brasiliensis*, Steindachner, 1879)



Fonte: Autor, 2023.

2.5 Aspecto de Qualidade do Pescado

O valor comercial do pescado está associado ao grau de frescor e manutenção da qualidade. O pescado de ótima qualidade mantém características físicas, químicas, sensoriais e microbiológicas próprias de peixe fresco, e, para que isso ocorra, é necessário que na captura ou despesca ocorram procedimentos apropriados de abate e acondicionamento em gelo (Bernardes *et al.*, 2021).

De acordo com o Decreto nº 9.013 de 2017 (Brasil, 2017), devem ser observadas e verificadas uma série de características sensoriais, respeitadas as particularidades de cada espécie, para a avaliação dos atributos de frescor do pescado e observação da manutenção de sua qualidade.

Peixe fresco corresponde àquele conservado somente pelo resfriamento, a uma temperatura próxima à 0°C. Deve possuir pele firme, bem aderida, úmida e sem a presença de manchas. Os olhos devem ser brilhantes e salientes. As escamas devem apresentar-se unidas entre si, brilhantes e fortemente aderidas à pele. As brânquias devem apresentar cor que vai da rosa ao vermelho intenso, ser brilhantes e sem viscosidade. O odor deve ser característico e não repugnante (Brasil, 2017).

Em relação aos aspectos microbiológicos, a Instrução Normativa nº 161, de 01 de Julho de 2022, estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Para pescados (peixes, crustáceos, moluscos) crus, temperados ou não, frescos, resfriados ou congelados, os parâmetros são conforme a presença ou ausência de *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus coagulase* positiva.

Além dessas características, os controles oficiais do pescado e derivados no âmbito da legislação brasileira (Brasil, 2017) abrangem o controle de histamina (amina biogênica) nas espécies formadoras, controle de biotoxinas ou de outras toxinas perigosas para saúde humana e controle de parasitas.

2.6 Patógenos e Indicadores de Condições Higiênico-Sanitárias

Todo alimento é definido qualificado devido a aspectos como tipo de produto, sua composição, ausência de microrganismos responsáveis pela deterioração, ausência de microrganismos patogênicos, suas propriedades nutricionais, funcionais, ausência de contaminantes químicos que se associam a consistência, sabor, cheiro, aparência entre outros (Tete, 2012). Podendo deste modo ser considerado fresco a todo o peixe que apresente condições sensoriais bem definidas, isto é, que não seja submetida a condições ambientais e de práticas inadequadas nos estabelecimentos industriais e comerciais, que possam favorecer a multiplicação dos microrganismos ou mesmo qualquer outro efeito que prejudique a qualidade do pescado (Freitas *et al.*, 2015).

As más práticas higiênicas ou sanitárias podem levar à contaminação do pescado durante a captura, manipulação, embalagem, processamento e/ou distribuição com uma variedade de micro-organismos, provenientes de alimentos, do ar, dos trabalhadores (por exemplo, mãos, roupas e cabelos sujos), de equipamentos e superfícies, de insetos, pássaros, morcegos, água de lavagem, gelo, caixas, veículos, dentre outros (Parlapani, 2021).

Portanto, é necessário que as condições de higiene do ambiente, e as boas práticas sejam encaradas com muita responsabilidade pelos produtores e comerciantes, de modo com que os alimentos sejam comercializados de forma segura e apresentem qualidades desejáveis (Freitas *et al.*, 2015).

Quando esses fatores não são atendidos, bactérias patogênicas podem se desenvolver causando infecções em seres humanos, devido seus fatores de virulência que participam desde a adesão até invasão de diferentes tecidos no hospedeiro (Proft & Baker, 2009).

É o caso da *Salmonella* sp., uma bactéria mesófila gram-negativa, anaeróbica ou aeróbia facultativa. É um patógeno comum aos peixes e distribuídos em vários ambientes. Podem ser detectados em piscicultura, principalmente nas que apresentam má condição de higiene e também nas diferentes etapas da cadeia de produção e comercialização do peixe, o que inviabiliza o pescado para consumo e prejudica a inocuidade do produto (De Souza Gazal *et al.*, 2018).

De acordo com Brooks *et al.* (2014), existem quatro sorotipos de *Salmonella* que podem causar doença e devem ter rotina de identificação devido sua relevância clínica, que são eles: *Salmonella paratyphi* A (sorogrupo A), *Salmonella paratyphi* B (sorogrupo B), *Salmonella choleraesuis* (sorogrupo C1) e a *Salmonella tiphy* (sorogrupo D). Usualmente a dose infectante varia de 10^7 a 10^8 unidades formadoras de colônia (Ministério da Saúde, 2011). A febre tifóide está relacionada com *Salmonellas tiphy* e *paratyphi*, já as de febre não tifóide estão envolvidas

as *Salmonella typhimurium* e *enteritidis* (Brooks *et al.*, 2014). Os sintomas relacionados à febre tifoide são graves e pessoas acometidas apresentam febre alta, septicemia, diarreia e vômitos.

Nas infecções ligadas às demais *Salmonella* também ocorrem quadros de diarreia e vômito, incluindo, além disso, febre moderada, dor abdominal, mal-estar geral, cansaço, perda de apetite e calafrios (Ministério da Saúde, 2019). A manifestação dos sintomas ocorre de 12 a 36 horas após a ingestão do alimento (Galdino *et al.*, 2013).

Os coliformes totais e termotolerantes possuem uma correlação direta com a qualidade higiênico-sanitária (Batista *et al.*, 2010). Além desse microrganismo, a *Escherichia coli* possui uma correlação direta com a qualidade higiênico-sanitário e é considerada uma indicadora de contaminação de origem fecal quando presente, e possivelmente um agente patógeno (Chandran; Hatha, 2005).

E. coli é um tipo de microrganismo anaeróbico definido como sendo bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que habitam no trato gastrintestinal do homem e em animais de sangue quente, considerados como sendo hospedeiros capazes de causar infecções em pessoas debilitadas e principal fonte de doenças diarreicas provenientes da ingestão de alimentos contaminados e água (Santiago *et al.*, 2013).

Embora algumas dessas bactérias façam parte da flora normal, elas podem ser patogênicas, sendo um dos principais microrganismos causadores de doenças veiculadas por alimentos. Esses patógenos podem ser classificados ou divididos em seis tipos: enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EAggEC) e difuso-aderentes (DAEC) (Souza, *et al.*, 2016). Além de causar distúrbios gastrointestinais, *E. coli* também podem causar infecções do trato urinário, respiratório, além de outras condições patológicas (Mittelstaedt & De Carvalho, 2006).

Um outro indicador higiênico-sanitário é o *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva, em formato de coco, especificamente grupos de cocos na forma de cachos de uva, com diâmetro que varia de 0,5 a 1,5 μm . Essa espécie é aeróbica ou anaeróbica facultativa (Somerville *et al.* 2009). Algumas características podem distinguir *S. aureus* de outras espécies, como a coloração amarelada ou dourada das colônias, coagulase positiva, fermentam manitol, além de serem capazes de lisar hemácias do hospedeiro (Jawetz & Levinson, 2005).

Essas bactérias são encontradas em indivíduos saudáveis, fazendo parte da microbiota da pele e mucosas de regiões diferentes do corpo, principalmente na cavidade nasal. Embora possa ser um microrganismo comensal, essa espécie é considerada um patógeno oportunista, podendo atingir diferentes tecidos e órgãos e causar desde infecções superficiais até sistêmicas, com grau de gravidade variável (Correal *et al.*, 2013). Essas infecções podem ser decorrentes

de transmissão comunitária ou em ambientes hospitalares, sendo que *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) estão relacionadas com taxas de morbidade e mortalidade expressivas (Rossiter *et al.*, 2017).

2.7 Histamina em Pescado

O pescado é considerado um alimento de alta digestibilidade, no entanto, pela sua própria composição, é um dos mais perecíveis, necessitando de cuidados adequados de manipulação, desde a captura até o consumo ou industrialização (Souza *et al.*, 2016).

A microbiota dos peixes pode refletir o seu habitat e representa a contaminação inicial do alimento, como as *Enterobacteriaceae* que refletem a poluição do ambiente aquático por efluentes (Dufour & Bartram, 2012). Além de fatores relacionados: temperatura, alimentação animal e salinidade da água (Ghanbari *et al.*, 2015) que, associados às incorretas condições de armazenamento e manipulação podem resultar na degradação da musculatura do peixe por ação enzimática e multiplicação microbiana, afetando a qualidade sanitária do alimento e segurança alimentar (Cai *et al.*, 2015).

Um produto decorrente da deterioração do pescado é a histamina, uma amina bioativa sintetizada pela descarboxilação de seu aminoácido precursor, a histidina (Windaus & Vogt, 1907).

Bactérias da microbiota natural do pescado e bactérias contaminantes são capazes de converter a histidina livre em histamina em peixes e também podem multiplicar-se em temperatura acima de 4 °C. Dentre as bactérias potencialmente capazes de descarboxilar a histidina formando a histamina, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Hafnia alvei*, *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium phosphoreum* e *Photobacterium psychrotolerans* foram isoladas de peixes incriminados em intoxicação por histamina (BIOHAZ, 2011).

A ingestão de altos valores de histamina, cuja formação em peixes está correlacionada com a manutenção de peixes escombrídeos em temperaturas inadequadas, geralmente acima de 4,4 °C pode levar a um quadro de intoxicação alimentar, conhecido como escombrotóxico ou intoxicação por histamina (Fish, 2011; Lehane & Olley, 2000; Ruiz-Capillas & Moral, 2004; Behling & Taylor, 1982; Evangelista *et al.*, 2016).

A intoxicação caracteriza-se por uma variedade de sintomas, semelhantes aos de reações alérgicas agudas. Os sintomas incluem náusea, vômito, diarreia, sensação de queimação oral ou gosto de pimenta, urticária, coceira, erupções vermelhas e hipotensão, dor de cabeça, urticária/prurido, palpitações/taquicardias e outros sintomas gastrointestinais, comuns a outras

doenças transmitidas por alimentos, como cólicas abdominais, diarreia, náusea e vômito (Evangelista *et al.*, 2016; BIOHAZ, 2011; Chang, 2008).

Mundialmente têm-se tomado medidas ou procedimentos para evitar a formação de histamina em pescado a fim de assegurar a proteção à saúde do consumidor e a qualidade do alimento (European Food Safety Authority, 2010). Considerando que a presença de histamina representa um risco à saúde humana, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela Portaria N° 185, DE 13 DE MAIO DE 1997, estabeleceu um nível de tolerância para histamina em pescados no valor de 100 mg/kg (MAPA, 1997).

Assim sendo, as aminas podem ser empregadas como parâmetro ou critério de qualidade (Donhauser *et al.*, 1993; Shakila *et al.*, 2001), refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênicas prevalentes durante a produção, processamento e armazenamento de certos produtos (Taylor, 1986; Veciana Nogués *et al.*, 1997). Podem também ser usadas como um indicador do alimento deteriorado, uma vez que a deterioração microbiana pode ser acompanhada pelo aumento da produção de descarboxilases (Halász *et al.*, 1994).

Uma vantagem do uso de aminas como critério de qualidade reside no fato destas serem termo resistentes, permanecendo no alimento mesmo após tratamento térmico (Glória *et al.*, 1999).

2.8 Pesquisa de histamina em pescado no Brasil

No Brasil, os casos da doença ocasionada pela histamina são pouco relatados devido à dificuldade de associar os sintomas à intoxicação por histamina ou os sintomas são relativamente brandos, nos quais as pessoas acometidas não procuram atendimento médico. Os relatos têm sido feitos apenas quando muitas pessoas são acometidas (Takemoto *et al.*, 2019).

Em uma relação de pesquisas realizadas durante o período de 2012 a 2022 quanto a pesquisa de histamina em pescados no Brasil, é possível obter algumas informações como mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Pesquisas realizadas durante o período de 2012 a 2022 quanto a pesquisa de histamina em pescados no Brasil

Pescado	Método de detecção	Quantidade de Histamina	Referência
Salmão	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	44,06 a 505,46 (mg/kg)	CORDEIRO, Karina Silva <i>et al.</i> , 2020
Sardinha	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	226,14 a 583,87 (mg/kg)	DE LIRA, Alessandra Danile <i>et al.</i> , 2020

Corvina	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	417,63 a 604,62 mg/kg (verão) e 258,52 a 533,24 mg/kg (inverno)	LIRA, Alessandra Danile, 2019
Bonito	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência	6407,9 mg/kg	TAKEMOTO, Emy <i>et al.</i> , 2019
Atum, Tilápia-do-Nilo Truta Arco-íris	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	ND	EVANGELISTA, Warley P. <i>et al.</i> , 2016
Atum e Sardinha	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência	1,07 mg/kg e 26,81, 0,35, 37,25, 9,97, 0,94 mg/kg	TAKEMOTO, Emy, 2016
Sardinha	Espectrofluorimetria	<1 mg/100g	DAMM, MS B ¹ <i>et al.</i> , 2014
Atum	Cromatografia líquida de alta eficiência	1076,5 mg/kg e 1534,7 mg/kg	TAKEMOTO, Emy <i>et al.</i> , 2014
Cavala, Serra, Sarda, Xaréu e Timbira	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	0,40, 0,01, 0,04, 0,00, 0,02 mg/kg	DE ARAÚJO, Deborah Helena Pimentel, 2013
Atum e Salmão	Cromatografia em camada delgada	1 a 10 (mg/100g)	RODRIGUES, Bruna Leal <i>et al.</i> , 2012

ND - Não Detectado.

Várias técnicas de detecção foram usadas para a quantificação de aminas biogênicas em amostras de alimentos, como é o caso da histamina (RUIZ-CAPILLAS & HERRERO, 2019; ÖNAL *et al.*, 2013). A quantificação é realizada principalmente por técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa e cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS), cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), cromatografia líquida de ultra eficiência, cromatografia líquida de par iônico, Eletroforese Capilar e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). Os métodos oficiais de análise da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) propõem o uso de métodos fluorimétricos (AOAC 977.13) ou outros métodos validados cientificamente equivalentes (AOAC, 1990; AOAC, 2012; ORDÓÑEZ *et al.*, 2016).

A histamina é a principal amina biogênica investigada em peixes, sendo a única amina com limites legais estabelecidos para o consumo humano. Em 2018, o comitê do Codex Alimentarius revisou o Código de Prática para Peixes e Produtos da Pesca (CXC 52-2003) restabelecendo o plano de amostragem para coleta de material para análise de histamina e o

nível máximo de histamina permitido para as espécies de peixes das famílias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* e *Scomberesocidae* e seus produtos (CODEX ALIMENTARIUS, 2018).

A norma técnica nº 40/94 do MERCOSUL e o regulamento técnico nº 185 de Identidade e Qualidade para Peixe Fresco (inteiro e eviscerado) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) fixa a identidade e a qualidade do pescado fresco destinado ao consumo humano. Nos parâmetros físico-químicos listados deve-se avaliar a histamina no músculo, nas espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae*, sendo que no teor de histamina deve ser inferior a 100 mg/kg (MERCOSUL, 1994; MAPA, 1997).

REFERÊNCIAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 977.13 Histamine in Sea food Fluorometric Method First Action 1977 Final Action 1987 Codex-Adopted. 1990

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Method. J. AOAC, n. 60, p. 1125-1131, 1977. CAS-51-45-6 (histamine). Revised: June 2003, September, November. 2012

BATISTA, V. da; FABRÉ, N. N. **Padrões espaciais e temporais na captura da serra, *Scomberomorus brasiliensis* (*Teleostei*, *Scombridae*), na pesca efetuada na costa do Maranhão, Brasil.** Brazilian Journal of Biology, v. 61, p. 541-546, 2001.

BEHLING, Alison R.; TAYLOR, Steve L. **Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation.** Journal of Food Science, v. 47, n. 4, p. 1311-1314, 1982.

BERNARDES, Luiza Coury et al. **A relevância dos processos de acondicionamento e armazenamento de pescados.** ANALECTA-Centro Universitário Academia, v. 6, n. 3, 2021.

BIGELOW, H. B. et al. **Fishes of the western North Atlantic.** Part three. New Haven, Sears Found. Mar. Res., Yale Univ, 1963.

BRASIL. **Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017.** Regulamenta a Lei Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei Nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial União, Brasília, 30 mar 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019.** Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 26 dez 2019.

BROOKS, Geo F. *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26.** AMGH Editora, 2014.

BUSSING, William A. **Freshwater fishes of Costa Rica.** Editorial Universidad de Costa Rica, 1998.

CAI, Luyun *et al.* **Effect of ϵ -polylysine in combination with alginate coating treatment on physicochemical and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) during refrigerated storage.** LWT-Food Science and Technology, v. 62, n. 2, p. 1053-1059, 2015.

CERVIGÓN, F. *et al.* **Fichas FAO de identificación de especies para los fines pesca. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de Sur América.** FAO, Roma (Italia), 1992.

CERVIGÓN, F. **Los peces marinos de Venezuela Volumen II.** Caracas, Venezuela: Fundación Científica Los Roques, 1993.

CHANDRAN, A.; HATHA, A. A. M. **Relative survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in a tropical estuary.** Water Research, New York, v. 39, p. 1397-1403, 2005.

CHANG, Shu-Chen *et al.* **Determination of histamine and bacterial isolation in swordfish fillets (*Xiphias gladius*) implicated in a food borne poisoning.** Food Control, v. 19, n. 1, p. 16-21, 2008.

CLARO, R. **Características generales de la ictiofauna.** Ecología de los peces marinos de Cuba, p. 55-71, 1994.

CODEX ALIMENTARIUS (2018). Revision of the code of practice for fish and fishery products (CXC 52-3002) and revisions of the section on sampling, examination and analyses related to 97 histamine food safety. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Hygiene, Fiftieth Session, Panama.

COLLETTE, B. B. ***Pomatomidae*. Bluefishes.** FAO species identification guide for fishery purposes, v. 4, p. 2650, 1999.

CORDEIRO, Karina Silva *et al.* Ocorrência de bactérias patogênicas e deteriorantes em sashimi de salmão: avaliação de histamina e de susceptibilidade a antimicrobianos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

CORREAL, Julio CD *et al.* ***Staphylococcus aureus* infections: change in epidemiology at Pedro Ernesto University Hospital/Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto.** Revista HUPE, v. 12, n. 3, p. 31-47, 2013.

DA SILVA, Geuza Cantanhêde; DE CASTRO, Antonio Carlos Leal; GUBIANI, Éder André. **Estrutura populacional e indicadores reprodutivos de *Scomberomorus brasiliensis* Collette, Russo e Zavala-Camin, 1978 (Perciformes: *Scombridae*) no litoral ocidental maranhense.** Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 27, n. 4, p. 383-389, 2005.

DAMM, MS B¹ *et al.* **Pontos críticos de temperatura para formação de histamina em etapas do processamento tecnológico de conserva de sardinha (*Sardinella brasiliensis*).**

DE ARAÚJO, DEBORAH HELENA PIMENTEL. **Determinação de histamina e outras aminas bioativas e perfil de ácidos graxos de peixes da região amazônica.** 2013.

DE LIRA, Alessandra Danile et al. Evaluating *Sardinella brasiliensis* quality indicators through the quantification of histamine and bacterial communities. **Heliyon**, v. 6, n. 8, p. e04461, 2020.

DE SOUZA GAZAL, Luís Eduardo *et al.* **Salmonella sp. em peixes—qual a importância para sanidade em pescado?**. Pesquisa Agropecuária Gaúcha, v. 24, n. 1/2, p. 55-64, 2018.

DONHAUSER, S.; WAGNER, D.; GEIGER, E. **Biogenic amines**: significance, occurrence and assessment. Brawelt International, v. 11, p. 100-107, 1993.

DUFOUR, Alain; BARTRAM, Jamie. **Animal waste, water quality and human health**. IWA publishing, 2012.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). **Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods**. Efsa Journal, v. 9, n. 10, p. 2393, 2011.

ESPÍRITO SANTO, RV do *et al.* **Peixes e camarões do litoral bragantino, Pará, Brasil**. Belém: Madam, p. 4-13, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the framework of Directive 2003/99/EC and of some other pathogenic microbiological agents for information derived from the reporting year 2009**. EFSA Journal, v. 8, n. 4, p. 1579, 2010.

EVANGELISTA, Warley P. *et al.* **Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish**. Food chemistry, v. 211, p. 100-106, 2016.

EVANGELISTA, Warley P. *et al.* Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish. **Food chemistry**, v. 211, p. 100-106, 2016.

FISCHER, W. **FAO species identification sheets for fishery purposes**. Western Indian Ocean (Fishing Area 51), p. I-IV, 1984.

FISH, F. D. A. **Fishery Products Hazards and Controls Guidance**. FDA: Silver Spring, MD, USA, 2011.

FREITAS, A. K. N. *et al.* **Condições higiênico-sanitárias de gêneros alimentícios comercializados no Mercado Central São José em Teresina-PI**. SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR ALIMENTAÇÃO E SAÚDE, v. 5, 2015.

FRIMODT, Claus *et al.* **Multilingual illustrated guide to the world's commercial warmwater fish**. Fishing News Books Ltda, 1995.

GALDINO, Vânia Maria Cristina Alves *et al.* **Virulência de Salmonella spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos**. Biosci. J. (Online), p. 932-939, 2013.

GHANBARI, Mahdi; KNEIFEL, Wolfgang; DOMIG, Konrad J. **A new view of the fish gut microbiome**: advances from next-generation sequencing. Aquaculture, v. 448, p. 464-475, 2015.

GIGLIOTTI, E. S. et al. **Spatial analysis of egg distribution and geographic changes in the spawning habitat of the Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis***. Journal of Fish Biology, v. 77, n. 10, p. 2248-2267, 2010.

GLÓRIA, M.B.A.; DAESCHEL, M.A.; CRAVEN, C.; HILDERBRAND Jr., K.S. **Histamine and other biogenic amines in albacore tuna**. Journal of Aquatic Food Products and Technology, v. 8, n. 4, p. 55-69, 1999.

GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, 2011.

GRANT, Ern M. **Guide to fishes**, 1982.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. **Biogenic amines and their production by microorganisms in food**. Trends in Food Science and Technology, v. 5, p. 42-49, 1994.

INTERNATIONAL GAME FISH ASSOCIATION *et al.* **World record game fishes**. International Game Fish Association, 1991.

JAWETZ, Ernest; LEVINSON, Warren. **Microbiologia médica e imunologia**. Porto Alegre, 2005.

LEHANE, Leigh; OLLEY, June. **Histamine fish poisoning revisited**. International journal of food microbiology, v. 58, n. 1-2, p. 1-37, 2000.

LIRA, Alessandra Danile. **Caracterização e quantificação de bactérias descarboxiladoras de histidina e sua relação com a presença de histamina no pescado**. 2019.

MAPA (1997). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade para Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado)**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, MAPA, portaria nº 185, maio, 1997.

MAY, J. L.; MAXWELL, J. G. H. **Trawl fish from temperate waters of Australia**. 1986.
MERCOSUL. **Identidad y calidad de pescado fresco**. Normas Técnicas, Mercosul/GMC/RES, nº 40/94, 1994.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria MAPA - 185, de 13/05/1997**. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-185-de-13-05-1997,670.html>. Acesso em: 26 Nov. 2022.

Ministério da Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella spp.***, 2011. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnosticosalmonella-spp-web.pdf>. Acesso em: 16 set. 2023.

Ministério da Saúde. ***Salmonella* (Salmonelose): o que é, causas, tratamento e prevenção**, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella-salmonelose>. Acesso em: 16 set. 2023.

MITTELSTAEDT, Simone; DE CARVALHO, Vania Maria. ***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157: H7**—revisão* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157: H7—review. Rev Inst Ciênc Saúde, v. 24, n. 3, p. 175-82, 2006.

ÖNAL, A.; Tekkeli, S.E.K.; Önal, C. Analytical Methods A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v. 138, p. 509- 515, 2013.

ORDÓÑEZ, José Luis et al. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages—A review. **Analytica chimica acta**, v. 939, p. 10-25, 2016.

PARLAPANI, Foteini F. **Microbial diversity of seafood**. Current Opinion in Food Science, v. 37, p. 45-51, 2021.

PROFT, Thomas; BAKER, E. N. **Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly and their role in disease**. Cellular and molecular life sciences, v. 66, p. 613-635, 2009.

RANDALL, John E. **Coastal fishes of Oman**. University of Hawaii Press, 1995.

RODRIGUES, Bruna Leal et al. Qualidade físico-química do pescado utilizado na elaboração de sushis e sashimis de atum e salmão comercializados no município do Rio de Janeiro, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1847-1854, 2012.

ROSSITER, Sean E.; FLETCHER, Madison H.; WUEST, William M. **Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance**. Chemical reviews, v. 117, n. 19, p. 12415-12474, 2017.

RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, Antonio. **Free amino acids and biogenic amines in red and white muscle of tuna stored in controlled atmospheres**. Amino acids, v. 26, n. 2, p. 125-132, 2004.

RUIZ-CAPILLAS, Claudia; HERRERO, Ana M. Impact of biogenic amines on food quality and safety. **Foods**, v. 8, n. 2, p. 62, 2019.

SANTIAGO, Janaína de Araújo Sousa *et al.* **Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados-revisão**. Arquivos de Ciências do Mar, v. 46, n. 2, 2013.

SAZIMA, I.; V.S. UIEDA, Virginia Sanches. **Adaptações defensivas em jovens de *Oligoplites palometa*** (Pisces, Carangidae). Rev. Bras. Biol, v. 39, n. 3, p. 687-694, 1979.

SAZIMA, Ivan. **Juvenile grunt (*Haemulidae*) mimicking a venomous leatherjacket (*Carangidae*), with a summary of Batesian mimicry in marine fishes**. Aqua, v. 6, p. 61-68, 2002.

SCHILLING, Hayden T. *et al.* **Age and growth of *Pomatomus saltatrix* in the south-western Pacific Ocean (eastern Australia), with a global comparison**. Marine and Freshwater Research, v. 74, n. 6, p. 463-478, 2023.

SHAKILA, R. J.; VASUNDHARA, T. S.; KUMUDAVALLY, K. V. **A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products**. Food Chemistry, n. 75, p. 255-259, 2001.

SILVA, Ladilson Rodrigues *et al.* **Caracterização da Fauna Acompanhante na Pescaria de Pescada Amarela (*Cynoscion acoupa*) do Município de Cururupu - MA: uma análise preliminar.** III Workshop Pós-Graduação das Ciências Agrárias, 2016. Disponível em: <http://www.cca.uema.br/wp-content/uploads/2018/05/ANAIS-V-SACA-2016-1.pdf>. Acesso em: 16 set. 2023.

SMITH, Lavett C. *et al.* **National audubon society field guide to tropical marine fishes Caribbean, Gulf of Mexico, Florida, Bahamas, Bermuda.** 1997.

SOMERVILLE, Greg A.; PROCTOR, Richard A. **At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 73, n. 2, p. 233-248, 2009.

SOUZA, André Luiz Medeiros de *et al.* **Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 82, p. 01-11, 2016.

SOUZA, Cintya de Oliveira *et al.* ***Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil.** Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

TAKEMOTO, Emy *et al.* **Peixe bonito assado: um caso de surto de intoxicação por histamina.** BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista, 2019.

TAKEMOTO, Emy *et al.* **Surto de intoxicação por histamina associado ao consumo de atum em conserva no Estado de São Paulo, Brasil.** BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista, v. 11, n. 126, p. 25-28, 2014.

TAKEMOTO, Emy. **Desenvolvimento de metodologia por cromatografia líquida de ultra eficiência para determinação de histamina em pescados in natura e em conservas.** 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TAYLOR, S.L. **Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects.** Critical Reviews in Toxicology, v. 17, p. 91-128, 1986.

TETE, Virgílio Salomão. **Avaliação da qualidade do peixe *Sillago sihama* comercializado nos mercados Costa do Sol e Porto de pesca de Maputo.** 2012.

TRINDADE-SANTOS, Isaac; FREIRE, Kátia de Meirelles Felizola. **Analysis of reproductive patterns of fishes from three large marine ecosystems.** Frontiers in Marine Science, v. 2, p. 38, 2015.

VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. **Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna.** Relationships with microbial counts, ATP- related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. J. Agric. Food Chem. p.2036-2041, Washington,1997.

WHITEHEAD, Peter JP. **FAO Species Catalogue**, v. 7, p. 305-579, 1988.

WINDAUS, Adolf; VOGT, W. **Synthese des Imidazolyl-äthylamins.** Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, v. 40, n. 3, p. 3691-3695, 1907.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários e bactérias produtoras de histamina em peixes comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís – MA.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar investigação qualitativa e quantitativa quando necessário de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. em amostras de peixes comercializados em feiras e supermercados de São Luís-MA;
- Comparar os resultados das análises de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. com a legislação vigente;
- Realizar contagem de bactérias mesófilas totais, psicrófilas totais e bactérias produtoras de histamina em amostras de peixes comercializados em feiras e supermercados de São Luís-MA em agar Niven;
- Realizar a identificação bioquímica das cepas de bactérias produtoras de histamina identificadas através do Kit Bactrey I e II.

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA FRENTE À INDICADORES DE QUALIDADE HIGIÊNICO SANITÁRIA EM PEIXES COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE SÃO LUIS – MA

IDENTIFICATION OF HISTAMINE PRODUCING BACTERIA IN ACCORDANCE WITH HYGIENIC AND SANITARY QUALITY INDICATORS IN FISH SOLD IN THE CITY OF SÃO LUIS - MA

Danilo Torres Cardoso^I, Adenilde Nascimento Moucherek^{II}, Amanda Mara Teles^{III}

^I Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

^{II} Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, São Luís, MA, Brasil

^{III} Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

RESUMO

A preocupação com a qualidade do pescado sempre foi um tema recorrente, visto que nem sempre atendem as condições higiênicas-sanitárias adequadas, o que acaba viabilizando a multiplicação de microrganismos formadores de histamina, que quando em níveis inadequados pode gerar preocupação para a saúde pública, resultando em surtos de intoxicação alimentar. Portanto, o trabalho propõe avaliar a presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários e bactérias produtoras de histamina em peixes das espécies *Scomberomorus brasiliensis* (Serra), *Oligoplites palometa* (Timbira), *Pomatomus saltatrix* (Anchova) e *Sardinella brasiliensis* (Sardinha) comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís – MA. Conforme resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que as amostras de peixes *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* e *Pomatomus saltatrix* analisadas se apresentam próprias para consumo quanto a padrões de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., enquanto que 20% das amostras de *Sardinella brasiliensis* encontram-se fora do padrão estabelecido pela legislação vigente brasileira. Além disso, foi constatado a presença de bactérias produtoras de histamina em sua maior parcela sendo da família *Enterobacteriaceae* na espécie *Sardinella brasiliensis*, o que pode comprometer a qualidade e segurança desse pescado, pois a possível presença da toxina produzida por essas bactérias pode ocasionar risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Intoxicação histamínica. *Enterobacteriaceae*. Deterioração.

ABSTRACT

Concern about the quality of fish has always been a recurring theme, as they do not always meet adequate hygienic-sanitary conditions, which ends up enabling the multiplication of histamine-forming microorganisms, which when at inadequate levels can cause concern for public health, resulting in outbreaks of food poisoning. Therefore, the work proposes to evaluate the presence of hygienic-sanitary indicator microorganisms and histamine-producing bacteria in fish of the species *Scomberomorus brasiliensis* (Serra), *Oligoplites palometa* (Timbira), *Pomatomus saltatrix* (Anchovy) and *Sardinella brasiliensis* (Sardines) sold at fairs and supermarkets in the city of São Luís – MA. According to the results obtained in the present study, it is possible to conclude that the fish samples *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* and *Pomatomus saltatrix* analyzed are suitable for consumption in terms of coagulase-positive *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. patterns, while 20% of the samples of *Sardinella brasiliensis* are outside the standard established by current Brazilian legislation. Furthermore, the presence of histamine-producing bacteria was found to be the largest part of the *Enterobacteriaceae* family in the species *Sardinella brasiliensis*, which could compromise the quality and safety of this fish, as the possible presence of the toxin produced by these bacteria could pose a risk to consumer health.

Keywords: Histamine Intoxication; *Enterobacteriaceae*; Deterioration.

1 INTRODUÇÃO

O termo pescado designa todo alimento que pode ser retirado de águas oceânicas ou interiores (doces ou salobras) e possa servir para alimentar o homem ou os animais. É um termo genérico, envolvendo peixes, crustáceos, moluscos, quelônios e algas (BRASIL, 2017).

Apesar da elevada importância nutricional, o pescado é o alimento de origem animal com maior probabilidade de deterioração, principalmente por apresentar pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos, alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microrganismos, acentuado teor de fosfolipídios e rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e nas vísceras do peixe (Gonçalves, 2011).

Uma comercialização sem obedecer às boas práticas de manipulação/fabricação relacionada ao manuseio inadequado, tais como, a falta de refrigeração e higiene no local e do manipulador, pode acarretar mudanças físico-químicas (diminuição do pH, oxidação de gorduras e alterações enzimáticas), sensorial (alteração de odor, aparência e textura) e microbiológicas (multiplicação bacteriana) (Sant'ana; Freitas, 2011). O monitoramento da qualidade do peixe comercializado é importante para garantir uma segurança alimentar (Maciel *et al.*, 2013).

Um produto decorrente da deterioração do pescado é a histamina, uma diamina biogênica primária e heterocíclica, não volátil e termoestável formada na descarboxilação bacteriana do aminoácido L-histidina, quando as condições de manuseio e estocagem são inadequadas, favorecendo a multiplicação de microrganismos que favorecem sua atividade (Moreira, 2018).

As bactérias produtoras desta enzima são Gram-negativas, mesófilas e psicotróficas da família *Enterobacteriaceae* e estão comumente presentes em ambientes aquáticos. O perigo da histamina em pescado é intensificado pela sua característica da não volatilidade, podendo conferir toxicidade ao produto mesmo antes deste ser considerado deteriorado ou sensorialmente inaceitável (Carmo *et al.*, 2010).

A intoxicação por histamina está entre as toxicidades mais comuns associadas ao consumo de pescado (EFSA & ECDC, 2018). Segundo o EFSA (2017), durante os anos de 2010 a 2015, 177 surtos causados por histamina associados ao consumo de pescado foram notificados em 12 estados-membros da União Europeia, envolvendo 973 casos com 104 hospitalizações. No Brasil, não existem dados oficiais sobre a ocorrência de casos de intoxicação por histamina, porém, na literatura, podem ser

encontrados vários relatos de surtos (Evangelista, 2010; Takemoto *et al.*, 2014; Lima Filho; Magalhães & Morais, 2018; Takemoto *et al.*, 2018).

Apesar de ser uma intoxicação comum, é pouco diagnosticada (ARES, 2017), podendo ser correlacionadas ao percentual de histamina ingerida, ressaltando que a sensibilidade individual e capacidade de desintoxicação do organismo, podem decorrer após o consumo em torno de duas horas (Cordeiro *et al.*, 2020).

A Portaria nº 185 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), diz que se entende por espécies formadoras de histamina as pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombresocidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae* (BRASIL, 1997). Essas espécies podem vir a formar um nível maior do que 100 ppm de histamina na musculatura, sendo que o nível mínimo para causar sintomas de intoxicação é de 100 ppm (Jay, 2005).

Diante disso, este trabalho propõe realizar uma avaliação microbiológica de interesse nas bactérias indicadoras higiênico-sanitárias e formadoras de histamina em peixes da espécie *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa*, *Pomatomus saltatrix* e *Sardinella brasiliensis*, comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís - MA.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo

Estudo transversal de natureza quantitativa.

2.2 Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de São Luís - MA, sendo coletado 20 amostras de *Scomberomorus brasiliensis* (Serra), 20 amostras de *Oligoplites palometa* (Timbira), 20 amostras de Anchova *Pomatomus saltatrix* (Anchova) e 20 amostras de *Sardinella brasiliensis* (Sardinha) nos principais pontos de comércio de peixe em São Luís - MA, sendo feiras e supermercados. As amostras foram acondicionadas em sacos estéreis e transportadas em caixa isotérmica com gelo para o Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água (PCQA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para análise imediata.

2.2 Análises microbiológicas

2.2.1 Preparo de diluições seriadas

Para a realização das análises foram necessárias o preparo de algumas diluições seriadas obtidas através da pesagem de 25g da amostra (musculatura do pescado) em 225mL em NaCl a 0,85% e homogeneizada em mesa agitadora (diluição 10^{-1}). A partir dessa diluição, foi transferido 1,0mL para um tubo de ensaio contendo 9mL de NaCl a 0,85% (diluição 10^{-2}), e assim, sucessivamente obtida as demais diluições (APHA, 2015).

2.2.2 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* foi realizado o método *spread-plate* conforme o APHA, (2015). Com as diluições realizadas no item anterior, foi inoculado 100 μ L da amostra na superfície de placas contendo agar Baird-Parker (BP). O inóculo foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski, e, em seguida, incubada em estufa a 35 °C/24 horas. Após esse tempo foi verificado o crescimento de colônias típicas e realizado a contagem de Unidades Formadoras de Colônias por grama do alimento (UFC/g).

2.2.3 Pesquisa e identificação de *Salmonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada conforme o APHA, (2015). Foram pesados 25g da amostra (musculatura do pescado) em 225m L de solução Peptonada Tamponada (pré-enriquecimento), e, em seguida, homogeneizada em mesa agitadora e incubada a 36 °C/24 horas. Posteriormente, alíquotas de 100 μ L das amostras pré-enriquecidas foram inoculadas em tubos contendo caldo Rappaport Vassiliadis, e, em seguida, levados para incubação à 36 °C/24 horas em estufa. Após as 24 horas foi realizado o plaqueamento em superfície de placas contendo agar Hektoen e incubação à 36 °C/24 horas. Em seguida, foram selecionadas as colônias típicas nas placas de agar Hektoen onde foram submetidas às provas bioquímicas de identificação.

2.2.4 Contagem e identificação de *Escherichia coli*

Para a quantificação de *Escherichia coli* foi utilizado a técnica dos tubos múltiplos de acordo com a APHA (2015) com adaptações, onde foram inoculados 1mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) preparados conforme item 2.2.1, em respectivos tubos contendo 9mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) ao qual foi observado turvação do meio e produção de gás a partir da lactose, denominado como teste presuntivo para coliformes, após 24/48h de incubação a 35°C. Em seguida, para a confirmação de presença de coliformes termotolerantes, foi transferido uma alçada de cada tubo suspeito para tubos contendo caldo EC, meio seletivo que contém lactose, e incubado por 24/48h a 35°C. Os tubos com turvação do meio e produção de gás foram repicados em placas contendo agar Eosina Azul de Metileno (EMB) para observação de crescimento de colônias típicas de *E. coli* (colônias com brilho metálico com centro escuro), após isso, foi realizado a técnica de esgotamento para purificação da colônia e posterior testes bioquímicos convencionais para confirmação do microrganismo. Após confirmação, foi realizado a contagem de Número Mais Provável por grama (NMP/g) referente a cada tubo proveniente da análise confirmatória.

2.2.5 Contagem de bactérias mesófilas, psicrófilas e produtoras de histamina no meio agar Niven

Para a contagem de bactérias mesófilas, psicrófilas e produtoras de histamina, foi utilizada a técnica de plaqueamento em profundidade (UFC/g) em meio Niven manipulado contendo os seguintes componentes: triptona de soja (0,5%), extrato de levedura (0,5%), L-histidina (2,7%), cloreto de sódio (0,5%), carbonato de cálcio (0,1%), ágar bacteriológico (2,0%), púrpura de bromocresol (0,006%), e acidificado em pH 5,3, conforme descrito por Moreira (2018), com adaptações. Foram inoculadas 1mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em placas contendo o meio Niven (1981). Após a completa solidificação do meio, as placas foram incubadas a 35°C e 20°C por um período de 24 horas, caracterizando-se a população de mesófilas (35 °C) e psicrófilas (20 °C) totais crescidas no meio e diferenciando-se as colônias típicas presuntivamente com histamina positiva (contadas após 5 dias da realização da análise) caracterizado pela presença de um halo arroxeadado, indicativo de alcalinização do meio pela presença da amina. Somente as cepas de histamina-positivas do meio Niven foram inoculadas em tubos contendo meio Niven em tubo inclinado e incubadas em estufa a 35 °C/24 horas. O teste foi considerado positivo quando houvesse a viragem de cor arroxeadada do meio indicando alcalinização pela presença da amina realizada pela cepa isolada.

2.2.6 Identificação bioquímica das bactérias produtoras de histamina no sistema Bactray I e II

Para identificação das bactérias produtoras de histamina, foi utilizado o Kit Bactray I e II, onde as culturas puras confirmadas no agar Niven foram semeadas em ágar nutriente pela técnica de esgotamento em estrias e incubadas a 35 °C/18 - 24 horas em estufa. Após esse tempo foi realizado o teste com Kit do Sistema Bactray I e II. Uma colônia pura da placa de Agar Nutriente foi homogeneizada em água estéril com turvação correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland, logo após, transferido 1,0mL do inóculo para o Kit Bactray e incubado por 18 - 24 horas em estufa 35 °C/24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados os reagentes conforme instruções do fabricante e realizado a leitura e cálculo pelo software online da Laborclin para determinação das espécies.

2.3 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados experimentais, foi realizado o teste one-way analysis of variance (ANOVA), seguido pelos pós-teste de Tukey's multiple comparison para avaliação dos microrganismos indicadores higiênico-sanitários e Kruskal-Wallis e Dunn's multiple comparison para microrganismos indicadores do tempo útil de conservação. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Microrganismos indicadores higiênico-sanitários

3.1.1 *Staphylococcus* coagulase positiva

Os resultados das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva realizadas nas 80 amostras de pescado *in natura* sendo das espécies *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa*, *Pomatomus saltatrix* e *Sardinella brasiliensis* comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís - MA, podem ser observados conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa em peixes comercializados de São Luís - MA

Espécies Analisadas	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase (UFC/g)	
	Negativa	Positiva
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	1,6x10 ⁶ ^a	0,0 ^a
<i>Oligoplites palometa</i>	3,9x10 ⁶ ^{a,d}	0,0 ^a
<i>Pomatomus saltatrix</i>	4,4x10 ⁵ ^b	0,0 ^a
<i>Sardinella brasiliensis</i>	5,3x10 ⁶ ^{a,b,d}	3,3x10 ⁴ ^b

* Valores das médias das 20 amostras / Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de One-way ANOVA pelo teste Tukey's multiple comparison.

Fonte: Cardoso (2023)

Conforme IN n° 161, de 1° de julho de 2022, o padrão para *Staphylococcus* coagulase positiva em pescado (peixes, crustáceos, moluscos) crus, temperados ou não, frescos, refrigerados ou congelados é definido como contagem máxima de 10³ UFC/g (ANVISA, 2022).

Após análise de variância e pós teste de Tukey's com 5% de significância feita a partir da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, é possível observar que não houve diferença estatística entre a espécie *Sardinella brasiliensis* e as demais estudadas, devido à ausência desses microrganismos nas amostras de *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* e *Pomatomus saltatrix*.

Além disso, é possível observar que 4% (n=3/80) das amostras estavam fora do padrão estabelecido pela ANVISA quanto ao padrão de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Bujjamma & Padmavathi (2015), apontam como fontes de contaminação dos pescados comercializados com a bactéria *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) a manipulação inadequada pelos feirantes e consumidores. A conservação imprópria do alimento com o uso de gelo contaminado, condições de armazenamento que favorecem a contaminação cruzada do pescado com outros alimentos que apresentam uma microbiota intrínseca distinta da encontrada na carne do peixe e a contaminação terciária mediada por moscas são fatores que promovem inoculação e a contaminação dos produtos seguida de deterioração do alimento e potencial aumento dos casos de infecto intoxicação alimentar entre os consumidores de pescado.

Além disso, de acordo com Peterson (1962a e 1962b), o crescimento do *S. aureus* é reprimido pela presença de outras populações de bactérias encontradas naturalmente nos alimentos, devido à competição por nutrientes e pela modificação do ambiente para condições menos favoráveis para o seu crescimento.

Apesar de não haver crescimento de colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva nas espécies *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* e *Pomatomus saltatrix*, houve crescimento de *Staphylococcus* coagulase negativa com contagens médias de $1,6 \times 10^6$ UFC/g para a espécie *Scomberomorus brasiliensis*, $3,9 \times 10^6$ UFC/g para a espécie *Oligoplites palometa*, $4,4 \times 10^5$ UFC/g para a espécie *Pomatomus saltatrix* e $5,3 \times 10^6$ UFC/g para a espécie *Sardinella brasiliensis*, sendo encontrado a presença desses microrganismos em 83% (n=66/80) das amostras analisadas.

Com base na análise de variância e pós teste de Tukey's com 5% de significância feita a partir da contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa, é possível observar que houve diferença estatística entre as espécies *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* e *Sardinella brasiliensis*; *Pomatomus saltatrix* e *Sardinella brasiliensis*; *Oligoplites palometa* e *Sardinella brasiliensis*.

Embora a legislação vigente não estabeleça padrões para *Staphylococcus* coagulase negativa, a presença dessa bactéria em alimentos também pode causar intoxicações alimentares. Considerando-se que os seres humanos são portadores naturais dessa bactéria na pele e em mucosas, deve-se adotar hábitos higiênico-sanitários durante a manipulação do pescado (LOPES *et al.*, 2012).

Em estudos pioneiros como de Cunha *et al.*, (2006), foi verificada a capacidade toxigênica de linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e identificaram por Polymerase Chain Reaction (PCR) os genes responsáveis pela produção de enterotoxinas. Além disso, o trabalho de Silva (2022), relata a existência de endotoxinas produzidas pelos SCN, o qual envolveu linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativa e revelou genes relacionados com o potencial patogênico, além da sua importância como um reservatório de genes, que podem ser transferidos para outras bactérias presentes em um mesmo nicho ecológico.

De forma a informar a população comerciante e consumidores, o *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa estão ligados diretamente as condições higiênico-sanitários do alimento, e para que um padrão de qualidade seja mantido é necessário adotar boas práticas de manipulação.

De acordo com Silva Jr. (2001) o método de Boas Práticas é um conjunto de normas de procedimentos para atingir um determinado padrão de identidade e

qualidade de um produto e/ou serviço entre os quais a produção de alimentos. Logo, são regras que, quando praticadas, ajudam a prevenir perigos, incluindo itens como higiene pessoal adequada, prevenção da contaminação pelos manipuladores de alimentos, higiene de utensílios, equipamentos e ambientes, controle de pragas, garantia da qualidade da água e cuidados com resíduos.

Hoje é possível obter vários tipos de cartilhas ou livros informativos quanto a manipulação adequada dos alimentos por parte do Governo Federal Brasileiro, a fim de que se aumente a consciência prática seja por parte de feirantes, comerciantes ou até mesmo do consumidor, como é o caso do Manual Técnico de Manipulação e Conservação de Pescado (2018) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (Cribb *et al.*, 2018).

Em pesquisa realizada por Ferreira *et al.*, (2014), resultados semelhantes ao da presente pesquisa foram verificados quanto a ausência de *Staphylococcus* coagulase positiva em 60 amostras de peixe Serra (*S. brasiliensis*) e $3,06 \times 10^6$ UFC/g de *Staphylococcus* coagulase negativa em 1,67% das amostras.

O contrário foi encontrado por Ogur (2022), onde encontrou 2,44 log UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de Anchova (*Engraulis encrasicolus*) obtido de fornecedores da cidade de Bitlis na Turquia.

3.1.2 *Salmonella* sp.

Os resultados da pesquisa de *Salmonella* sp. realizadas em 80 amostras de pescado *in natura* das espécies *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa*, *Pomatomus saltatrix* e *Sardinella brasiliensis* comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís - MA, são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 – Percentual da presença de *Salmonella* sp. de peixes comercializados em São Luís - MA

Espécies Analisadas	Presença de <i>Salmonella</i> sp.
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	0,0% ^a
<i>Oligoplites palometa</i>	0,0% ^a
<i>Pomatomus saltatrix</i>	0,0% ^a
<i>Sardinella brasiliensis</i>	20,0% ^b

* Percentual de 20 amostras. Percentual seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de One-way ANOVA pelo teste Tukey's multiple comparison.

Fonte: Cardoso (2023)

Conforme IN n° 161, de 1° de julho de 2022, o padrão para *Salmonella* em pescado (peixes, crustáceos, moluscos) crus, temperados ou não, frescos, refrigerados ou congelados é ausência em 25g (ANVISA, 2022).

Após análise de variância e pós teste de Tukey's com 5% de significância feita a partir da contagem de *Salmonella* sp., é possível observar que não houve diferença estatística entre a espécie *Sardinella brasiliensis* e as demais estudadas, devido à ausência desses microrganismos nas amostras de *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* e *Pomatomus saltatrix*.

Comparando os resultados contidos na tabela 2 com o padrão estabelecido pela ANVISA, é possível afirmar que as amostras de *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* e *Pomatomus saltatrix* encontram-se dentro do padrão estabelecido pela ANVISA. Enquanto 5% (n=4/80) das amostras da espécie *Sardinella brasiliensis* encontram-se fora do padrão por apresentar *Salmonella* sp.

A presença desse microrganismo em pescado pode ser explicada pelo fato dessa bactéria conseguir facilmente se desenvolver em meio aquático, dessa forma, parte da contaminação ocorre no meio em que o pescado é cultivado. Outro fator de contaminação, trata-se da forma como é conservado e manipulado o produto para comercialização, como destacam os autores Da Silva *et al.*, (2020).

Ao se consumir um pescado contaminado por *Salmonella*, os riscos não se tratam apenas quanto a presença da bactéria no produto. A infecção pode ocorrer quando a parte consumida é contaminada durante o manuseio do pescado, conduzindo microrganismos para a musculatura do peixe, equipamentos, outros alimentos e ambiente de preparo (Soares *et al.*, 2020).

Por isso, é importante a realização do controle efetivo de salmoneloses para que se conheça o perfil epidemiológico de *Salmonella* sp., sendo esse perfil influenciado por diversos fatores, como práticas de elaboração de alimentos, padrões de higiene e saneamento, diferença entre hábitos alimentares e criação de animais (Carrasco; Morales-Rueda; García-Gimeno, 2012).

Resultado similar ao encontrado na presente pesquisa foi divulgado por Barreto *et al.*, (2020), onde foi observado a presença de *Salmonella* spp. em amostras de peixe Sardinha (*Sardinella brasiliensis*) coletados de supermercados do centro da cidade de Cruz das Almas-BA.

Pesquisa realizada por Oliveira Neto (2018), com amostras de peixe Serra (*S. brasiliensis*) coletadas em estabelecimentos comerciais de peixes, constatou ausência

de *Salmonella* sp. em 100% das amostras. Além disso, resultados semelhantes foram encontrados em outras pesquisas (Perez *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014) para o peixe Serra em mercados públicos na região sudeste do Brasil.

3.1.3 *Escherichia coli*

Resultados da contagem de *Escherichia coli* em 80 amostras de pescado *in natura* das espécies *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa*, *Pomatomus saltatrix* e *Sardinella brasiliensis* comercializados em feiras e supermercados na cidade de São Luís – MA podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 - Percentual da presença de *E. coli* de peixes comercializados em São Luís - MA

Espécies Analisadas	Presença de <i>E. coli</i>
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	10,0% ^a
<i>Oligoplites palometa</i>	0,0% ^a
<i>Pomatomus saltatrix</i>	0,0% ^a
<i>Sardinella brasiliensis</i>	0,0% ^a

* Percentual de 20 amostras. Percentual seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p<0,05) pelo teste de One-way ANOVA pelo teste Tukey's multiple comparison.

Fonte: Cardoso (2023)

Conforme IN n° 161, de 1° de julho de 2022, o padrão para *Escherichia coli* em pescado (peixes, crustáceos, moluscos) crus, temperados ou não, frescos, refrigerados ou congelados é definido como contagem máxima de 5x10² NMP/g (ANVISA, 2022).

Após análise de variância e pós teste de Tukey's com 5% de significância feita a partir da contagem de *E. coli*, é possível observar que não houve diferença estatística entre a espécie *Sardinella brasiliensis* e as demais estudadas, devido à ausência desses microrganismos nas amostras de *Scomberomorus brasiliensis*, *Oligoplites palometa* e *Pomatomus saltatrix*.

De acordo com os resultados expressos na tabela 3, é possível observar que houve a presença de *E. coli* em 2,5% (n=2/80) nas amostras da espécie *Scomberomorus brasiliensis* analisadas, porém, dentro do padrão estabelecido pela ANVISA por apresentarem 43 NMP/g.

Em um estudo realizado por Sanchez e Ruocco Jr. (2004), foi afirmado que os coliformes estão sujeitos a interferentes como *Pseudomonas aeruginosa* que em altas concentrações é responsável por resultados falso-negativos das análises colimétricas.

Portanto, a ausência ou baixa quantificação de *E. coli* nas amostras analisadas pode ser explicada por uma possível interferência de grande quantidade de microrganismos que dificultam o crescimento nos meios de cultura, como é o exemplo da *Pseudomonas aeruginosa*.

Sendo um alimento bastante perecível, a qualidade do pescado depende de vários fatores como, do controle de temperatura durante todas as etapas de captura, e das boas práticas de higiene e segurança alimentar por parte dos manipuladores durante a sua venda (Hoel *et al.*, 2017; Alegria, 2020). Sua manipulação deve ser extremamente rigorosa, caso contrário pode-se elevar o risco de incidência de microrganismos indicadores de qualidade, como coliformes totais e termotolerantes, nos quais a *Escherichia coli* é a espécie mais relevante do grupo, sendo comumente associada a doenças transmitidas por alimentos (DTA's) (Nascimento, 2019; Amaral & Silva, 2021).

Medidas como o emprego de boas práticas na manipulação e conservação por partes dos comerciantes, e o cozimento total do pescado sendo realizado pelo consumidor que adquire esse tipo de produto, são ações de extrema importância para que se evite DTA's e impactos na saúde pública local.

No trabalho realizado por Bannina *et al.*, (2003), observaram em estudo comparativo de microrganismos que crescem em comunidades mistas nos biofilmes de águas subterrâneas, que a bactéria *P. aeruginosa* possui vantagem sobre *E. coli* e demais membros do gênero *Enterobacteriaceae*, representando, portanto, risco à saúde pública.

Além disso, resultado semelhante ao exposto nesse trabalho foi encontrado por Ferreira (2014), que coletou amostras de peixe Serra (*Scomberomorus brasiliensis*) no porto do município de Raposa - Ma, e evidenciou a presença de *E. coli* em apenas 1 amostra de 12, além da avaliação do gelo utilizado para conservação com contaminação de 25% das amostras.

3.2 Microrganismos indicadores do tempo útil de conservação

3.3.1 Microrganismos mesófilos e psicrófilos totais

Os resultados da quantificação de bactérias mesófilas e psicrófilas na musculatura dos peixes comercializados em São Luís - MA, utilizando ágar Niven, foram submetidos a análise estatística e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Contagem de bactérias mesófilas e psicrófilas totais de peixes comercializados em São Luís - MA

Espécies Analisadas	Contagem de bactérias (Log UFC/g)	
	Mesófilas Totais	Psicrófilas Totais
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	6,25 ^a ± 4,56	6,11 ^a ± 5,08
<i>Oligoplites palometa</i>	6,98 ^{b,c} ± 6,23	7,28 ^c ± 6,65
<i>Pomatomus saltatrix</i>	6,28 ^b ± 6,18	7,28 ^b ± 6,65
<i>Sardinella brasiliensis</i>	5,63 ^{a,c} ± 5,46	5,64 ^{a,b,c} ± 5,34

*Valores das médias das 20 amostras ± desvio padrão/ Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis pelo teste Dunn's multiple comparison.

Fonte: Cardoso (2023)

Após análise de variância e pós testes de Kruskal-Wallis e Dunn's com 5% de significância feita a partir da contagem de bactérias mesófilas totais, foi observado diferença estatística entre as espécies *Scomberomorus brasiliensis* e *Sardinella brasiliensis*, *Pomatomus saltatrix* e *Oligoplites palometa*, *Sardinella brasiliensis* e *Oligoplites palometa*. Na contagem de bactérias psicrófilas totais foi observado diferenças estatísticas significativas entre a espécie *Sardinella brasiliensis* e as demais estudadas neste trabalho (tabela 4).

A IN n° 161, de 1° de julho de 2022 não determina padrão para microrganismos mesófilos e psicrófilos em pescados, porém, a *International Commission Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1986) sugere valores máximos de 7,0 log UFC/g em amostras de peixes destinadas ao consumo humano, contagem é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária de alimentos (BORDIGNON *et al.*, 2010).

Assim, com base na legislação da ICMSF (1986), 27,5% (n=22/80) das amostras de peixe analisadas estavam fora do padrão para contagem de bactérias psicrófilas totais.

Apesar da contagem de microrganismos mesófilos estarem dentro do padrão estabelecido pela ICMSF (1986), de acordo com da Silva Lopes *et al.*, (2012), as bactérias mesófilas poderão continuar sua multiplicação, pois sua presença pode estar relacionada ao armazenamento inadequado e temperatura favorável, necessitando de medidas que desacelerarão o processo de deterioração do pescado.

Em alimentos a contagem de bactérias mesófilas em placas é normalmente utilizada para avaliar as condições sanitárias dos produtos (BARCELLOS *et al.*, 2016), em que aqueles com altas contagens podem apresentar alterações sensoriais no sabor, odor e textura, além de menor prazo de validade comercial (SANTOS, 2011).

Germano *et al.*, (2003) salientaram também o papel desempenhado pelo manipulador de alimentos como origem do problema para os consumidores e grandes responsáveis por contaminação cruzada.

Além disso, bactérias psicrófilas em alimentos são caracterizadas por realizarem atividades proteolíticas e lipolíticas, com capacidade de crescimento e multiplicação em temperaturas de refrigeração (LANZARIN *et al.*, 2011), sendo constituída principalmente por *Pseudomonas* spp., *Alteromonas* spp., *Shewanella putrefasciens*, *Acinetobacter* spp. e *Moraxella* spp. (FORSYTHE, 2013).

Scherer *et al.* (2004), afirmam que as bactérias psicrófilas aumentam significativamente ao longo da armazenagem e que só a utilização do gelo clorado é capaz de reduzir a contagem e aumentar a vida útil em três dias.

Os resultados encontrados apontam falhas quanto ao armazenamento do produto, além disso, durante a coleta das amostras era possível observar manipulação de forma inadequada, onde os comerciantes não utilizavam de boas práticas.

3.3.2 Microrganismos mesófilos e psicrófilos produtores de histamina

Os resultados da quantificação de bactérias mesófilas e psicrófilas produtoras de histamina com diferenciação utilizando agar Niven, podem ser observados na tabela 5, acompanhadas de análise estatística.

Tabela 5 - Contagem de bactérias mesófilas e psicrófilas produtoras de histamina em peixes comercializados em São Luís - MA

Espécies Analisadas	Contagem de bactérias (Log UFC/g)	
	Mesófilas	Psicrófilas
<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	3,74 ^a ± 3,34	3,50 ^a ± 3,41
<i>Oligoplites palometa</i>	0,0 ^b ± 0,0	0,0 ^b ± 0,0
<i>Pomatomus saltatrix</i>	0,0 ^b ± 0,0	0,0 ^b ± 0,0
<i>Sardinella brasiliensis</i>	0,0 ^b ± 0,0	0,0 ^b ± 0,0

* Valores das médias das 20 amostras ± desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis pelo teste Dunn's multiple comparison.

Fonte: Cardoso (2023)

Conforme análise de variância e pós testes de Kruskal-Wallis e Dunn's com 5% de significância feita a partir da contagem de bactérias mesófilas e psicrófilas produtoras de histamina, é possível observar que não houve diferença estatística entre a espécie *Scomberomorus brasiliensis* e as demais estudadas, devido a ausência desses microrganismos nas amostras de *Oligoplites palometa*, *Pomatomus saltatrix* e *Sardinella brasiliensis*.

Ao avaliar a presença de bactérias produtoras de histamina nas amostras de *Scomberomorus brasiliensis*, é correto afirmar que as condições de armazenamento do pescado não seguiram um padrão de acondicionamento.

Não se pode falar de conservação sem que seja citado a influência do tempo, temperatura e higiene. Esses fatores são fundamentais para um produto de qualidade, mas, uma vez que apenas um desses termos não seja seguido, a fisiologia do animal dará condições para a microbiota do organismo se proliferar, decorrendo a formação de aminas biogênicas, no caso a histamina (Taylor, 1986).

O mesmo acontece com os níveis de histidina livre nos tecidos dos peixes, que podem variar com a espécie, a idade, o período reprodutivo e a estação do ano, como já foi documentada em Arenques (*Clupea harengus*), com o nível mais alto observado no verão (Hughes, 1959).

Carneiro (2018), realizando pesquisa no muco superficial da pele e nas brânquias do peixe Cavala (*Scomberomorus cavalla*), encontrou na superfície da pele um valor de 4,52 Log UFC/cm² para bactérias mesófilas cultiváveis, e 4,67 Log UFC/cm² para bactérias produtoras de histamina. Para as brânquias 5,53 Log UFC/brânquia para bactérias mesófilas cultiváveis, e 6,8 Log UFC/brânquia para bactérias produtoras de histamina.

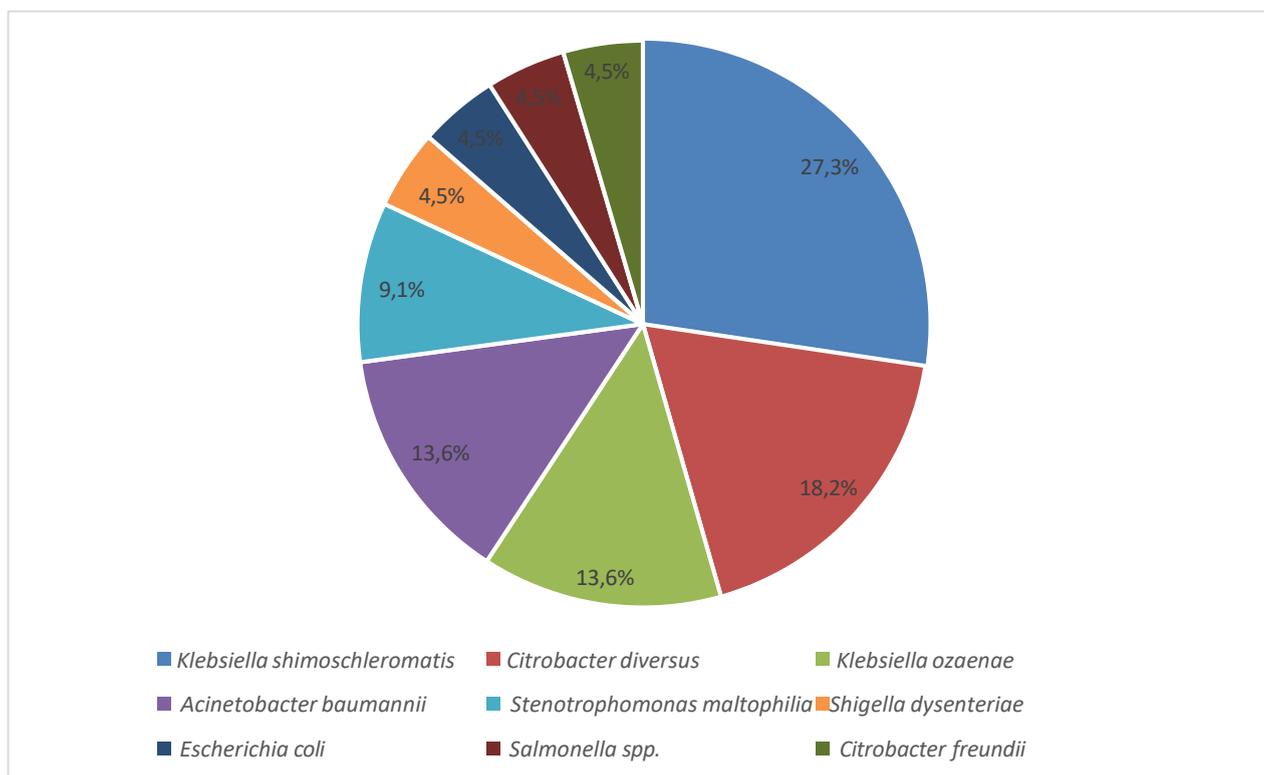
Em estudo realizado por Maia (2022), utilizando espécie de peixe Serra (*Scomberomorus brasiliensis*) com análises das brânquias e superfície do pescado obtidos de feiras livres da cidade de Fortaleza – CE, obteve-se 40 bactérias produtoras de histamina e 40 bactérias heterotróficas cultiváveis.

3.3.3 Identificação de bactérias produtoras de histamina

As bactérias produtoras de histamina isoladas da espécie *Scomberomorus brasiliensis* tiveram um percentual de 77,3% sendo bactérias mesófilas e 22,7%

bactérias psicrófilas e as identificações encontradas conforme testes bioquímicos podem ser observados na figura 1.

Figura 1 - Espécies de bactérias produtoras de histamina isoladas de peixes comercializados em São Luís-MA



Fonte: Cardoso (2023)

Das 22 espécies identificadas, 27,3% (n=6/22) foram *Klebsiella shimoschleromatis*, 18,2% (n=4/22) foram *Citrobacter diversus*, 13,6% (n=3/22) foram *Klebsiella ozaenae* e *Acinetobacter baumannii*, 9,1% (n=2/22) foram *Stenotrophomonas maltophilia*, 4,5% (n=1/22) foram *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Citrobacter freundii*.

Diversos pesquisadores concordam que a microbiota do pescado reflete a água onde esses animais vivem, visto que, os tecidos internos de um peixe sadio são estéreis (Nickelson; Mccarthy; Finne, 2001). Porém, outros fatores devem ser avaliados quanto a qualidade de um pescado em seu estado final, como é o caso da manipulação, armazenamento e conservação. Analisando as espécies identificadas é possível concluir que 77,3% (n=17/22) fazem parte da família das *Enterobacteriaceae*.

A presença de enterobactérias nos alimentos é de suma importância para indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo, pós-processamento. As enterobactérias são representadas por um grupo de microrganismos que vivem no trato digestivo de animais e humanos, e, desta forma,

se tornam microrganismos indicadores da qualidade de um determinado alimento (Franco, 2005).

Ao avaliarem a presença de histamina em camarões de cativeiro, Andrade *et al.*, (2008) observaram que a maioria dos microrganismos presentes nas amostras também pertenciam à família *Enterobacteriaceae*, sendo as principais espécies *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca* correspondendo a 60,8% das bactérias produtoras.

Os resultados das identificações obtidos nessa pesquisa são esperados quando comparados com espécies de bactérias produtoras de histamina já citadas na literatura, como por exemplo, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, dentre outras (Veciana-Nogués *et al.*, 1997; Landete *et al.*, 2007; Joneza, 2004).

O gênero *Klebsiella* faz parte da flora dos peixes e é um dos principais produtores de histamina (Chang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013). Além disso, o gênero foi o de maior prevalência no estudo com 45,4% (n=9/22) nas amostras.

A *Klebsiella* é uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae* e é considerada um importante veiculador de DTA's em pescados e seus derivados, principalmente, produtos oriundos de águas contaminadas, manipulação inadequada e sem cuidados higiênico-sanitários mínimos. Estes fatores acarretam a obtenção de um produto de baixa qualidade e que são riscos à saúde dos consumidores (Macena *et al.*, 2017). O quadro de intoxicação pode ocorrer, e frequentemente está associado a pescados que sofreram conservação inadequada, especialmente, refrigeração imprópria, fazendo com que a enzima histamina-decarboxilase presente em bactérias que colonizam os peixes convertam a histidina em histamina (Sabater *et al.*, 1995).

Assim como no presente estudo, Moreira *et al.*, (2018) também constataram a presença de *Klebsiella ozaenae* em amostras de peixe Cavala e Dourado coletados em pontos de venda em Maceió – AL, bem como a espécie *Citrobacter freundii* em 3,7% dos isolados do peixe Dourado.

Portanto, é de suma importância o atendimento dos parâmetros de qualidade de pescados fornecidos em feiras e supermercados, pois, uma vez que esse tipo de alimento possua características histaminogênicas, depois de formada, a histamina dificilmente é eliminada do alimento devido suas características de não volatilidade e termoestabilidade (Iriart; Torres, 2013; Carmo *et al.*, 2010).

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que há presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários nos pescados avaliados, apontando a existência de falhas de boas práticas de manipulação e armazenamento. Além disso, foi constatado a presença de bactérias produtoras de histamina que em sua maior parcela sendo da família *Enterobacteriaceae* podendo comprometer a qualidade e segurança desse alimento, pois a possível presença da toxina produzida por essas bactérias pode ocasionar intoxicação alimentar, sendo um risco à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

- ALEGRIA, S. J. C. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de peças de sushi prontas para consumo. 2020. 113 p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2020.
- AMARAL, R. C. G. do *et al.* Qualidade microbiológica de sushis comercializados em um shopping center na cidade de Recife-PE. 2021. 16 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) - Faculdade Pernambucana De Saúde, Recife, 2021.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: APHA, 2015.
- ANDRADE, C. D. S. *et al.* Determinação da microbiota histamina positiva em camarão Histamina. Revista do Instituto Adolfo Lutz, Salvador, v. 1, p. 46-51, mar. 2008.
- ARES, J. L. C. *et al.* Escombroidosis: un tipo de intoxicación alimentaria, no una alergia. FMC: Formación Médica Continuada en Atención Primaria, v. 24, p. 240-246, 2017.
- AUTHORITY, European Food Safety *et al.* The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSa Journal, v. 15, n. 12, 2017.
- BANNING, Natasha; TOZE, Simon; MEE, Brian J. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. Microbiology, v. 149, n. 1, p. 47-55, 2003.
- BARCELLOS, Carolina Cristina Colão *et al.* Influência da aplicação de irradiação por feixe de elétrons na qualidade microbiológica de filés de Corvina (*Micropogonias furnieri*) refrigerados. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 68, p. 535-542, 2016.
- BARRETO, Norma Suely Evangelista *et al.* Qualidade microbiológica e físico e química de peixes congelados comercializados em supermercados de Cruz das Almas, Bahia. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 2, p. 9099-9108, 2020.

BORDIGNON, Adriana Cristina et al. Elaboração de croquete de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a partir de CMS e aparas do corte em 'V' do filé e sua avaliação físico-química, microbiológica e sensorial. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 32, n. 1, p. 109-116, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº9013 de 29 de março de 2017. Aprova Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal -RISPOA, Brasília, DF, março 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 724, de 01 de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_724_2022_.pdf/33c61081-4f32-43c2-9105-c318fa6069ce. Acesso em: 01 de mai 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Institui o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Peixe Fresco (Inteiro ou Eviscerado). *Diário Oficial da União, Brasília*, 19 de maio de 1997.

BUJJAMMA, P. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in fish samples of local domestic fish market. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 4, n. 5, p. 427-433, 2015.

CARMO, F.B.T.; MÁRSICO, E.T.; CLEMENTE, SCS; CARMO, R.P.; FREITAS, M.Q. Histamina em conservas de sardinha. *Revista Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.1, p.174-180, 2010.

CARNEIRO, Ana Patrícia Cavalcante. Estudo da microbiota formadora de histamina em Cavala (*Scomberomorus cavalla*) e avaliação da atividade bactericida de óleos essenciais. 2018.

CARRASCO, Elena; MORALES-RUEDA, Andrés; GARCÍA-GIMENO, Rosa María. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, v. 45, n. 2, p. 545-556, 2012.

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

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

CORDEIRO, Karina Silva et al. Occurrence of pathogenic and spoilage bacteria in salmon sashimi: histamine and antimicrobial susceptibility evaluation. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 23, 2020.

CRIBB, A. Y.; DE SEIXAS FILHO, J. T.; MELLO, S. C. R. P. Manual técnico de manipulação e conservação de pescado. Brasília: Embrapa, 2018.

CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 70-74, 2006.

DA SILVA LOPES, Ilderlane et al. Pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) desembarcada: características microbiológicas e qualidade do gelo utilizado na sua conservação. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 4, p. 677-684, 2012.

DA SILVA, Weverson Ailton et al. FATORES QUE INFLUENCIAM O CONSUMO DO PESCADO NO SEMIÁRIDO. *Revista Científica Rural*, v. 22, n. 1, p. 205-215, 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. 2017.

EVANGELISTA, Warley Pinheiro. Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009. 2010.

FERREIRA, Elka Machado et al. Qualidade microbiológica do peixe Serra (*Scomberomerus brasiliensis*) e do gelo utilizado na sua conservação. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 81, p. 49-54, 2014.

FORSYTHE, Stephen J. *Microbiologia da segurança dos alimentos*. Artmed Editora, 2013.

FRANCO, Bernadette D. G. M; LANDGRAF, Mariza, Maria Tereza Destro. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. *Microbiologia dos alimentos*. In: *Microbiologia dos alimentos*. 2003. p. 182-182.

GERMANO, Pedro Manuel Leal; GERMANO, Maria Izabel Simões. *Agentes bacterianos de toxinfecções. Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos*, 2003.

HOEL, Sunniva; JAKOBSEN, Anita Nordeng; VADSTEIN, Olav. Effects of storage temperature on bacterial growth rates and community structure in fresh retail sushi. *Journal of Applied Microbiology*, v. 123, n. 3, p. 698-709, 2017.

HUGHES, R. B. Chemical studies on the herring (*Clupea harengus*). II.—The free amino-acids of herring flesh and their behaviour during post-mortem spoilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 10, n. 10, p. 558-564, 1959.

ICMSF. *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*. *Ecologia Microbiana de los Alimentos* 2, 1985.

IRIARTE, M. M; TORRES, M. M. Incidência de histamina e bactérias indicadoras de qualidade higiênica em filetes de peixe, rodas e pedaços de espécies pelágicas comercializadas em um mercado de peixe na Ilha Margarita (Venezuela). *INHRR*, Caracas, v. 44, n. 1, p. 15-24, 2013.

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. São Paulo: Artmed; 2005. 706p.

Joneja, J.M.; Fellow, H.R. (2004). Histamine Intolerance, Diamine Oxidase Activity, and Probiotics. School of Biosciences University of Birmingham, U.K, 2004.

LANDETE, J.M.; FERRER, S.; PARDO, I. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. Food Control, v. 18, n. 12, p. 1569-1574, 2007.

LANZARIN, M. et al. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e microrganismos psicrotróficos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de Pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, p. 1541-1546, 2011.

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

LIMA FILHO, Carlos Diógenes Ferreira de; MAGALHÃES, Fernando Jorge Rodrigues; MORAIS, Eduardo Guelfer Ferrer de. Surto de intoxicação alimentar por ingestão de histamina em peixes de Fernando de Noronha. Anais do VIII Simpósio de Controle de Qualidade do Pescado, 2018.

MACENA, T. N. S.; FERREIRA, M. H.; GOMES, I. D.; SANTOS, T. G. Análise qualitativa do perfil microbiológico de peixe in natura comercializado no mercado municipal de Teixeira de Freitas, BA. Revista Mosaicum, n. 25, p. 171-182, 2017.

MACIEL, Erika Da Silva et al. Relationship between the price of fish and its quality attributes: a study within a community at the University of São Paulo, Brazil. Food science and technology, v. 33, p. 451-456, 2013.

MAIA, Eduarda Torres. Quantificação de bactérias produtoras de histamina (Bph) em espécies de peixe Serra (*Scomberomorus Brasilienses*). 2022.

MOREIRA, Jammily de Oliveira Vieira et al. Segurança microbiológica e bactérias produtoras de histamina em cavala (*Scomberomorus cavalla* Cuvier, 1829) e dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) comercializados em MACEIÓ-AL. 2018.

NASCIMENTO, C. A. C. do et al. Análise microbiológica de amostras de sushi e sashimi a base de salmão comercializados na cidade do Rio de Janeiro. 2019.

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

NIVEN JR, C. F.; JEFFREY, M. B.; CORLETT JR, D. A. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v. 41, n. 1, p. 321-322, 1981.

OGUR, S. Carga de bactérias patogênicas e segurança de peixes marinhos de varejo. Brazilian Journal of Biology, v. 82, 2022.

OLIVEIRA NETO, José Tavares de et al. Qualidade de peixes tilápia (*Oreochromis niloticus*) e Serra (*Scomberomorus brasiliensis*) comercializados em feiras livres e mercados públicos. 2018.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. GDGF; PERALES, LH; CORTECERO, MDS Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005.

PÉREZ, Agar Costa Alexandrino de et al. Evaluation of seafood quality market in Baixada Santista/SP. 2014.

PETERSON, A. C.; BLACK, J. J.; GUNDERSON, M. F. Staphylococci in Competition. Vol. I: Growth of Naturally Occurring Mixed Populations in Precooked Frozen Foods during Defrost. Appl. Microbiol. v. 10, p.16-22, 1962^a.

PETERSON, A. C.; BLACK, J. J.; GUNDERSON, M. F. Staphylococci in Competition. Vol. II: Effect of Total Numbers and Proportion of Staphylococci in Mixed Cultures on Growth in Artificial Culture Medium. Appl. Microbiol. v. 10, p. 23-30, 1962^b.

SABATER, E. I. L.; JEREZ, J. J. R.; HERRERO, M. H.; SAGUÉS, A. X. R.; VENTURA, M. T. M. Sensory Quality and Histamine Formation during Controlled Decomposition of Tuna (*Thunnus thynnus*). Journal of Food Protection, v.59, p.164-172, 1995.

SANCHEZ, P. S.; RUOCCO JR., J. Controle de qualidade de águas minerais naturais: novos conceitos e tendências recentes da legislação Internacional. Apostila do participante, 2004.

SANT'ANA, L. S.; FREITAS, MQ de. Aspectos sensoriais do pescado. GONÇALVES, AA Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, 2011.

SANTOS, Ana Paula Billar dos. Índices químicos, sensoriais e microbiológicos para avaliação do frescor de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) armazenada em gelo. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SCHERER, Rodrigo et al. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). Food Science and Technology, v. 24, p. 680-684, 2004.

SILVA JR, Eneo Alves da. Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos. 4^a edição. Livraria Varela, São Paulo, 2001.

SILVA, Nayara de Oliveira Gonçalves da et al. Análise da virulência e resistência a antimicrobianos em linhagens de *Staphylococcus* spp. através de técnicas de genômica e proteômica. 2022.

SOARES, Ricardo Vieira et al. Peixes: da escolha ao preparo. ANALECTA-Centro Universitário Academia, v. 5, n. 5, 2020.

TAKEMOTO, Emy et al. Peixe bonito assado: um caso de surto de intoxicação por histamina. BEPA-Boletim Epidemiológico Paulista, 2019.

TAKEMOTO, Emy et al. Surto de intoxicação por histamina associado ao consumo de atum em conserva no Estado de São Paulo, Brasil. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista, v. 11, n. 126, p. 25-28, 2014.

TAYLOR, Steve L.; EITENMILLER, Ronald R. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. CRC Critical Reviews in Toxicology, v. 17, n. 2, p. 91-128, 1986.

VECIANA-Nogués, M. T.; MARINE-Font, A.; VIDAL-Carou, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP- related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. Journal of Agricultural and Food Chemistry

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme abordado no presente trabalho, foi constatado a presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários nos pescados analisados, isto é, presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp., indicando falhas nos processos de manipulação e armazenamento do produto estudado. Apesar de algumas amostras estarem de acordo com a legislação vigente, a presença desses microrganismos mesmo que em quantidades permitidas, podem em determinado momento ser favorecido por aspectos que ajudem na multiplicação deles, vindo a ser considerados inadequados para consumo.

Além disso, conforme contagem de bactérias mesófilas totais e psicrófilas totais foi percebido uma alta carga microbiana nos pescados avaliados, o que pode comprometer as características organolépticas do produto, bem como indicar más condições sanitárias pela qual o pescado possa ter passado. Isso corrobora com os resultados encontrados quanto a presença de bactérias produtoras de histamina no pescado *Scomberomorus brasiliensis*, onde dentre as espécies identificadas a maior parcela foi da família das *Enterobacteriaceae* e gênero *Klebsiella*, indicando que esse pescado possa ter sido obtido de um ambiente de água contaminada, além dos outros fatores já citados como manipulação inadequado e forma incorreta de armazenamento.

A presença de microrganismos produtores de histamina em pescados é preocupante pelo fato da intoxicação causado ser pouco divulgada e/ou até mesmo pouco conhecida pelos profissionais, o que acaba sendo associado a outras DTA's, devido a isso, soma-se a importância de conhecer e alertar sobre a qualidade microbiológica desse tipo de alimento fornecido aos consumidores.

Para o caso desta seção primária (títulos principais) em específico: **Título da seção** em fonte Opens Sans 12, maiúsculas, alinhamento à esquerda, negrito, espaçamento 1,5. **Conteúdo da seção** em fonte Opens Sans 12, espaçamento 1,5 e parágrafos com recuo de 1,25.

A introdução deve conter elementos essenciais a uma plena compreensão do texto. Sugere-se que os autores iniciem o artigo com uma breve contextualização do assunto e, após, apresentem o PROBLEMA que foi investigado e será elucidado. Também se sugere que sejam apontados de forma clara os OBJETIVOS do artigo. Ao final da introdução recomenda-se que seja realizada uma apresentação sucinta da estrutura geral do artigo de modo a permitir que o leitor compreenda como o assunto será abordado a partir de então.

As notas de rodapé¹ são organizadas com **números arábicos** (1, 2, 3...), em fonte Open Sans 10, alinhamento à esquerda, somente com a primeira letra maiúscula ou em palavras as quais o idioma exige.

1.1 Título de subseção [se houver]

Título da subseção em fonte Open Sans 12, alinhamento à esquerda, espaçamento 1,5 cm, somente com a primeira letra maiúscula ou em palavras as quais o idioma exige (ex.: nomes próprios). **Conteúdo da subseção** em fonte Open Sans 12, espaçamento 1,5 e parágrafos com recuo 1,25.

1.1.1 Exemplo de seção abaixo de subseção [se houver]

Título da seção abaixo da subseção em fonte Open Sans 12, alinhamento à esquerda, espaçamento conforme o modelo acima, somente com a primeira letra maiúscula ou em palavras as quais o idioma exige (ex.: nomes próprios).

Atenção: seguir rigorosamente todas as normas da revista quanto ao modo de fazer citações e referenciá-las. Abaixo segue um exemplo de citação longa (mais de 3 linhas). Em caso de citação curta (3 linhas ou menos), basta inseri-la entre aspas no corpo do texto. Lembrar que a REMOA adota o sistema “Autor/a, data” para menções de referências das citações no corpo do texto

Citação longa (mais de 3 linhas) em fonte Open Sans 10, espaçamento simples (1,0), recuo à esquerda de 4cm, alinhamento justificado, espaços anterior e posterior simples 1,0. Citação longa (mais de 3 linhas) em fonte Open Sans 10, espaçamento simples (1,0), recuo à esquerda de 4cm, alinhamento justificado, espaços anterior e posterior simples 1,0. Citação longa (mais de 3 linhas) em fonte Open Sans 10, espaçamento simples (1,0),

¹ Exemplo de nota de rodapé.

recoo à esquerda de 4cm, alinhamento justificado, espaços anterior e posterior simples 1,0.

Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento entrelinhas 1,5, parágrafos com recuo 1,25. Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento entrelinhas 1,5, parágrafos com recuo 1,25. Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento 1,5, parágrafos com recuo 1,25. Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento entrelinhas 1,5, parágrafos com recuo 1,25. Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento entrelinhas 1,5, parágrafos com recuo 1,25.

1.1.1.1 Exemplo de mais uma subseção

Caso o trabalho exija mais uma subseção, este modelo deve ser utilizado. Os títulos das seções e subseções devem seguir uma ordem lógica e apresentados de acordo com este modelo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e pré-tratamento da amostra

Redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento 1,5, parágrafos com recuo 1,25. Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento 1,5, parágrafos com recuo 1,25.

Colocar “aspas duplas para **citação direta** com até três linhas, fazendo referência a autoria, ano da obra e número da página de onde foi retirada” (AUTOR/A, 2017, p. 2).

Indicar com colchetes se precisar suprimir algum trecho na citação [...]. Deve-se sempre referenciar autor/a, ano da obra e número da página de onde foi retirado o texto. Todas as citações em língua estrangeira deverão ser traduzidas para o português, desde que essa tradução não afete o sentido original da frase. (AUTOR/A, 2017, p. 2).

As citações deverão ter chamadas no corpo do texto pelos sobrenomes, ano de publicação e também, para citações diretas, o número da página.

Para menção da autoria no contexto da frase, só a inicial deve ser em letra maiúscula, e quando a menção é feita entre parênteses, todas as letras devem ser maiúsculas, como nos exemplos abaixo:

Conforme afirma Corrêa (1997, p. 152), "O espaço enquanto objetivação geográfica do estudo da cidade apresenta várias facetas que permitem que seja estudado de modo multivariado".

OU:

"O espaço enquanto objetivação geográfica do estudo da cidade apresenta várias facetas que permitem que seja estudado de modo multivariado" (CORRÊA, 1997, p. 152)

Os artigos só podem fazer referência a figuras (fotos, mapas, imagens ou gráficos), quadros ou tabelas. Toda a figura, quadro ou tabela que for utilizada deve ser chamada no texto (figura 1 e quadro 1) antes de aparecer, conforme o exemplo a seguir: o título da figura 1 é sucinto e completo.

Figura 1 - Título de apresentação sucinto e completo. Em títulos com mais de uma linha justificar e manter à esquerda



Fonte: Autores/as (2020)

Legenda: As legendas devem ser colocadas abaixo das fontes.

Nota: Caso seja uma foto tirada pelos próprios autores ou autoras, indicar Fonte: Acervo particular dos autores (setembro de 2017)

Importante: o que difere um quadro de uma tabela visualmente é que o quadro é fechado nas laterais e a tabela é aberta. As tabelas e quadros ficam melhor dispostos em página única, portanto, sempre que possível, realizar o arranjo dos textos para atender este item.

Quando não for possível, pode ocorrer do texto sofrer algum ajuste na diagramação, para que o título acompanhe a figura, quadro ou tabela, sempre posicionado acima. Ver quadro 1.

Quadro 1 - Os quadros devem ter seus títulos na parte superior

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4
Linha 1	Valor 1	Valor 2	Valor 3
Linha 2	Valor 4	Valor 5	Valor 6
Linha 3	Valor 7	Valor 8	Valor 9
Linha 4	Valor 10	Valor 11	Valor 12
Linha 5	Valor 13	Valor 14	Valor 15

Fonte: as fontes dos quadros devem ser colocadas na parte inferior. Quando expõe dados produzidos na pesquisa, indicar: Organização dos autores.

Tabela 1 - As tabelas devem ter seus títulos na parte superior

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4
Linha 1	Valor 1	Valor 2	Valor 3
Linha 2	Valor 4	Valor 5	Valor 6
Linha 3	Valor 7	Valor 8	Valor 9
Linha 4	Valor 10	Valor 11	Valor 12
Linha 5	Valor 13	Valor 14	Valor 15

Fonte: as fontes das tabelas devem ser colocadas na parte inferior. Quando reproduzida integralmente, indicar Fonte: Sobrenome (ano)

As equações aparecem o corpo do texto, sendo enumeradas pelo lado direito entre parênteses, como:

$$y = ax + b \tag{1}$$

onde:
 Open Sans 10;
 espaçamento simples;
 com os tópicos divididos por ponto e vírgula.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento 1,5, parágrafos com recuo 1,25. Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento 1,5, parágrafos com recuo 1,25. Continuação da redação do texto com conteúdo da seção em fonte Open Sans 12, espaçamento 1,5, parágrafos com recuo 1,25.

AGRADECIMENTOS [SE HOVER]

Escreva aqui seus agradecimentos, se houver.

REFERÊNCIAS

As referências devem ser colocadas em ordem alfabética, com fonte Open Sans tamanho 12, espaçamento simples, sem recuo de primeira linha, espaçamento de 12 pt depois de cada uma, obedecendo os seguintes critérios:

Livro: SOBRENOME do/a autor(a) da obra, Prenomes abreviados. **Título da obra:** subtítulo. Número da edição. Local de Publicação: Editora, ano de publicação. Citam-se todos, separados por ponto e vírgula. Sobrenome inglês precedido de Mac ou Mc permanece na mesma forma. A expressão *et al.* será utilizada somente no texto para mais de três autores. Nas referências, recomenda-se que a autoria seja citada em sua totalidade, com exceção de um grande número de autores/as.

LEFF, E. **Discursos sustentáveis**. São Paulo: Cortez, 2010.

Mac LAUGHLIN, J. **Reimagining the nation-state**. The contested terrains of nation-building. London (Inglaterra): Pluto Press, 2001. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 2ª Ed. Brasília, 2021.

MATEO RODRIGUEZ, J. M. *et al.* **Estructura geográfica ambiental y sostenibilidad de las cuencas hidrográficas urbanizadas de Cuba el ejemplo de la cuenca del río Quibú**, provincia Ciudad de La Habana: resultados del Proyecto Caesar. La Habana (Cuba): Editorial Universitaria, 2008.

NOVO, M. **La educación ambiental**. Bases éticas, conceptuales y metodológicas. 2. ed. Madrid (Espanha): Editorial Universitas, 2003.

Capítulo de livro: SOBRENOME, Prenomes abreviados. Título do capítulo: subtítulo. *In:* SOBRENOME, Prenomes abreviados. (org. OU ed.) **Título da obra:** subtítulo. Número da edição. Local de Publicação: Editora, ano de publicação. Página inicial e final do capítulo. Exemplos:

ROSENDAHL, Z. Território e territorialidade: uma perspectiva geográfica para o estudo da religião. *In:* CORRÊA, R. L.; ROSENDAHL, Z. (org.). **Geografia: temas sobre cultura e espaço**. Rio de Janeiro: Editora UERJ, 2005. p. 191-226.

LUZZI, D. A “ambientalização” da educação formal. Um diálogo aberto na complexidade do campo educativo. *In:* LEFF, E. (org.). **A complexidade ambiental**. São Paulo: Cortez, 2003. p. 178-216.

Artigo de periódico: SOBRENOME DO(A) AUTOR(A) DO ARTIGO, Prenomes abreviados. Título do artigo: subtítulo. **Título do Periódico**, cidade de publicação, número do volume, número do fascículo, páginas inicial e final do artigo, mês e ano. Exemplos:

BRANDÃO, P. R. B. Devotos, sábios e viajantes: os geógrafos do mundo islâmico medieval. **Geog Ens Pesq**, Santa Maria, e3, ago. 2018. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/geografia/article/view/23355>. Acesso em: 27 jan. 2020. DOI 10.5902/2236499423355.

TRENTIN, R; SANTOS, L. J. C; ROBAINA, L. E. S. Compartimentação geomorfológica da bacia hidrográfica do Rio Itu - Oeste do Rio Grande do Sul - Brasil. **Soc. & Nat.**, Uberlândia, v. 24 n. 1, p.127-142, jan./abr. 2012.

HÖFLING, E. M. Estado e políticas (públicas) sociais. **Cadernos Cedes**, Campinas, v. 21, n. 55, p. 30-41, novembro/2001. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0101-32622001000300003&script=sci_arttext. Acesso em: 5 jan. 2016.

Dissertações e Teses: SOBRENOME, Prenomes abreviados. **Título da obra:** subtítulo. Ano de defesa. Número de páginas. Categoria (Grau e Área de Concentração) - Instituição, Local, Ano do documento. Exemplos:

ROVANI, F. F. M. **Zoneamento de risco climático do cultivo da Nogueira Pecã (*Carya illinoensis*) para o Rio Grande do Sul**. 2016. 232 p. Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

JUNCKES, I. J. **O sindicalismo novo dos bancários na reestruturação financeira dos anos noventa no Brasil**. 2004. 214 p. Tese (Doutorado em Sociologia Política) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MOURA, G. S. S. **Análise do gerenciamento dos resíduos sólidos urbanos do município de Mossoró-RN**. 2011. 45 p. Monografia (Bacharel em Ciência e Tecnologia) - UFERSA, Mossoró-RN, 2011.

Trabalhos apresentados em eventos científicos: SOBRENOME, Prenomes abreviados. Título do trabalho. In: NOME DO EVENTO, Número da edição, Cidade onde se realizou o evento. **Anais [...]** ou **Proceedings [...]** ou **Resumos [...]** Local de publicação: Editora, Ano de publicação. Páginas inicial e final do trabalho. Exemplos:

SILVA, J. M. P. Poder, governo e território em Carajás In: ENCONTRO NACIONAL DA ANPEGE, 6., 2005, Fortaleza. **Anais [...]** Fortaleza: Expressão Gráfica, 2005. p. 120-121.

LOPES, L. S. O.; SILVA, O. G. Paisagem e patrimônio geomorfológico: revisão conceitual. In: ENCONTRO NACIONAL DA ANPEGE, 11. A diversidade da geografia brasileira: escalas e dimensões da análise e da ação, 2015, Presidente Prudente. **Anais [...]** Presidente Prudente: ANPEGE, 2015. p. 9355-9365.

1 – Nome completo autor/a:

Titulação,

link do Orcid e e-mail:

Contribuição:

2 – Nome completo autor/a:

Titulação

link do Orcid e e-mail:

Contribuição:

3 – Exemplo de nome

Engenheiro Ambiental, Doutor em Engenharia Ambiental

<https://orcid.org/0000-0000-0000-0000> • exemplodeemail@ufsm.com

Contribuição: Escrita - Primeira Redação

Como citar este artigo

AUTORIA. Título do artigo. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 44, exx, 2022. DOI 10.5902/2179460Xxxxxx. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/2179460Xxxxxx>.