

ÉRICA BARBOSA SANTOS

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO CAMARÃO CRU,
DESCASCADO E RESFRIADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADOR: PROF. Dr. ROBSON MAIA FRANCO.

CO-ORIENTADORA: PROF^a Dra. ELIANE TEIXEIRA MÁRSICO.

Niterói

2011

ÉRICA BARBOSA SANTOS

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO CAMARÃO CRU,
DESCASCADO E RESFRIADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovado em 09 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Maia Franco - Orientador
UFF

Prof^a. Dra. Eliane Teixeira Mársico – Co-orientadora
UFF

Prof^a. Dra. Karen Signori Pereira
UFRJ

Niterói/RJ
2011

Dedicatória

Dedico essa dissertação a minha mãe Maria de Lourdes Barbosa Santos (*in memoriam*) que, durante a sua existência, sempre me incentivou a estudar e ir além.

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo total apoio e incentivo durante a realização do Mestrado.

Ao meu namorado Hugo Claudino Machado pelo amor e auxílio tecnológico.

A minha amiga-irmã Prof^a. Dra. Samira Pirola Santos Mantilla por todos os momentos de realização do experimento e confecção da dissertação.

Aos meus queridos amigos da turma de Mestrado de 2009 pela união na longa jornada acadêmica, por todos os momentos de auxílio, alegria e lazer.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Robon Maia Franco, pela amizade, pela sugestão do tema deste trabalho, carinho, paciência e ensinamentos.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Eliane Teixeira Mársico, pelo total apoio, pelos ensinamentos, por ser uma pessoa adorável de astral contagiante.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pelo auxílio na Análise Estatística.

Pela Prof^a. Dra. Karen Signori Pereira por ter aceito participar da minha banca examinadora.

Ao Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, seus Professores e Funcionários.

A Capes pela ajuda financeira.

BIOGRAFIA

Graduada na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense em 2000, Érica Barbosa Santos, brasileira, natural de São Gonçalo, nascida em 1974, filha de Lafaiete Bernardo Santos e Maria de Lourdes Barbosa Santos, efetuou estágios durante seu período acadêmico na própria Universidade Federal Fluminense, no Instituto Vital Brazil e na Inspeção Federal de Indústria Alimentícia do interior do Estado do Rio de Janeiro.

Em 2000, graduou-se e continuou trabalhando na indústrias da área de Produtos de Origem Animal até 2004 nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Goiás.

No ano de 2004, após aprovação em concurso público, a autora assumiu o cargo de Assistente Administrativo da Prefeitura Municipal de Saquarema (2006), onde atuou na Secretaria de Administração (Controladoria) e Secretaria de Saúde (Vigilância Sanitária e Posto de Saúde de Sampaio Corrêia).

De 2006 a 2008 cursou duas especializações: Especialização em Irradiação de Alimentos (UFF) e Especialização em Programa Especial em Formação de Docentes (FORDOC/UNIVERSO).

Em 2009 ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, como bolsista da Capes, por dois anos e direcionou o seu conhecimento, com maior dedicação, para a área de Controle Bacteriológico e Físico-Químico, devido ao tema de sua dissertação apresentada em 2011: Avaliação Bacteriológica e Físico-Química do Camarão Cru, Descascado e Resfriado.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 9

LISTA DE TABELAS, p. 10

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 12

RESUMO, p. 14

ABSTRACT, p. 15

1 INTRODUÇÃO, p. 16

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, p. 18

2.1 PERFIL DA CARCINICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO, p. 18

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CAMARÃO, p. 19

2.3 QUALIDADE E DETERIORAÇÃO DO PESCADO RESFRIADO, p. 20

2.3.1 Parâmetros Bacteriológicos de Qualidade, p. 21

2.3.1.1 *Staphylococcus* Coagulase Positiva, p. 24

2.3.1.2 *Salmonella* spp., p. 27

2.3.1.3 Enterobacteriáceas, p. 30

2.3.1.3.1 Principais gêneros da Família Enterobacteriaceae, p. 33

2.3.2 Parâmetros Físico-Químicos de Qualidade, p. 36

2.3.2.1 Temperatura, p. 39

2.3.2.2 Formação das Bases Voláteis Totais, p. 39

2.3.2.3 pH, p. 41

2.3.2.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada Histamina, p. 43

2.3.2.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), p. 45

2.3.2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, p. 47

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 49

3.1 MATERIAL, p. 49

3.1.1 Equipamentos e material de uso geral, p. 49

3.1.2 Material de Consumo, p. 50

3.1.3 Material Biológico, p. 50

3.2 MÉTODOS, p. 51

3.2.1 Estratégia Experimental, p. 51

3.2.2 Obtenção das amostras, preparo e processamento das sub-amostras, p. 52

3.2.3 Análises Bacteriológicas, p. 53

3.2.3.1 Preparo das soluções e meios de cultura, p. 53

3.2.3.2 Cuidados higiênico-sanitários, p. 53

3.2.3.3 Contagem de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva, p. 53

3.2.3.4 Pesquisa de Bactérias do gênero *Salmonella* spp., p. 55

3.2.3.5 Contagem Total de Enterobacteriáceas, p. 56

3.2.4 Análises Físico-Químicas, p. 57

3.2.4.1 Aferição da Temperatura, p. 57

3.2.4.2 Avaliação da Produção de Bases Voláteis Totais (BVT), p. 58

3.2.4.3 Determinação do pH, p. 59

3.2.4.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada, p. 59

3.2.4.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), p. 60

3.2.4.6 Identificação e Quantificação de Histamina pelo Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), p. 62

4 RESULTADOS, p. 64

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 64

4.1.1 Contagem de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva, p. 64

4.1.2 Pesquisa de Bactérias do gênero *Salmonella* spp., p. 64

4.1.3 Contagem Total de Enterobacteriáceas, p. 65

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 66

4.2.1 Aferição da Temperatura, p. 66

4.2.2 Avaliação da Produção de Bases Voláteis Totais (BVT), p. 67

4.2.3 Determinação do pH, p. 68

4.2.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada, p. 69

4.2.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), p. 70

4.2.6 Identificação e Quantificação de Histamina pelo Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), p. 71

5 DISCUSSÃO, p. 74

5.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 74

5.1.1 Contagem de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva, p. 74

5.1.2 Pesquisa de Bactérias do gênero *Salmonella* spp., p. 75

5.1.3 Contagem Total de Enterobacteriáceas, p. 76

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 76

5.2.1 Aferição da Temperatura, p. 76

5.2.2 Avaliação da Produção de Bases Voláteis Totais (BVT), p. 76

5.2.3 Determinação do pH, p. 77

5.2.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada, p. 78

5.2.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), p. 79

5.2.6 Identificação e Quantificação de Histamina pelo Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), p. 79

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 80

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 81

8 APÊNDICES, p. 98

8.1 COLÔNIAS DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM PLACA, p. 98

8.2 TRÊS MEIO DE CULTURA PARA ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp.: ÁGAR SALMONELLA DIFERENCIAL, ÁGAR VERDE BRILHANTE E ÁGAR HEKTOEN, p. 98

8.3 COLÔNIAS DE ENTEROBACTÉRIAS EM ÁGAR CRISTAL VIOLETA VERMELHO NEUTRO BILE GLICOSE, p. 99

8.4 INCUBAÇÃO DE PLACAS COM ÁGAR BAIRD PARKER COM GEMA DE OVO E TELURITO DE POTÁSSIO PARA ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA E DE PLACAS COM VRBG PARA ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS, p. 99

8.5 PLACAS DE BVT ANTES E APÓS A TITULAÇÃO COM ÁCIDO CLORÍDRICO, p. 100

8.6 FILTRAGEM DAS AMOSTRAS DURANTE A FASE DE EXTRAÇÃO NA CLAE, p. 100

8.7 TUBOS CÔNICOS COM SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS A SEREM APLICADAS NA PLACA DE SÍLICA GEL (SIGMA[®]) DURANTE A CCD, p. 100

8.8 TUBOS DE ENSAIO CONTENDO DESTILADO E TBA LEVADOS À FERVURA, p. 101

8.9 CROMATÓGRAFO, COLUNA, DETECTOR E IMPRESSORA DE CLAE, p. 101

8.10 IMPRESSÃO DE GRÁFICO MOSTRANDO PICO DE HISTAMINA, p. 101

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Camarões crus descascados resfriados utilizados neste estudo, f. 51

QUADRO 1 Quantidade proporcional do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), da água destilada e do ácido acético para a reação com o malonaldeído presente nas amostras analisadas, f. 61

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Frequência e Percentual de Incidência de *Salmonella* spp. em 60 amostras de camarão cru, descascado e resfriado comercializado em um Mercado de Peixe do Município de Niterói/RJ, distribuídas em 12 boxes, f. 65
- TABELA 2** Médias (\log_{10} UFC.g⁻¹) e Desvios Padrão (\log_{10} UFC.g⁻¹) dos valores encontrados na Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Enterobactérias agrupados em 12 boxes com 5 amostras cada, f. 66
- TABELA 3** Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão, além de número e percentual de não conformidades da temperatura, f. 67
- TABELA 4** Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão, número e percentual de não conformidades de BVT, f. 68
- TABELA 5** Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão, além de número e percentual de não conformidades do pH, f. 69
- TABELA 6** Resultados positivos para Histamina obtidos na Avaliação da Produção de Cadaverina, Histamina e Putrescina, por CCD, em μL , detectados em 7 amostras, f. 69
- TABELA 7** Frequência de cada amina biogênica ao longo dos 12 boxes analisados, f. 70
- TABELA 8** Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão, número e percentual de não conformidades de TBARS, f. 71

- TABELA 9** Resultados da concentração de Histamina utilizando CLAE para sete amostras de camarão positivas pelo método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em seus diferentes dias de estocagem, f. 72
- TABELA 10** Resultados dos valores de p e F para as análises estatísticas realizadas, f. 72
- TABELA 11** Equação, ρ , R (Coeficiente de Correlação Múltipla) e R^2 (Coeficiente de Determinação Múltipla) de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, Enterobactérias com Físico-Químico e Enterobactérias com Aminas Biogênicas, f. 73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
Aa	Atividade de água
ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
ABs	Aminas Biogênicas
BVT	Bases Voláteis Totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAO	Diaminoxidase
DMA	Dimetilamina
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
Eh	Potencial de oxi-redução
FA	Formaldeído
FAO	“Food and Agriculture Organization”
FDA	“Food and Drugs Administration”
g	Grama
g	Gravidade
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
Kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
MAO	Monoaminoxidase
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMA	Monometilamina
N	Normal
N-HMT	Histamina N-Metiltransferase
nm	Nanômetro
nº	Número
OTMA	Óxido de Trimetilamina
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
R\$	Real
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SSP	Solução Salina Peptonada
T	Volume da solução de Ácido Tricloroacético
TBA	“Thiobarbituric Acid”
TBARS	“Thiobarbituric Acid Reactive Substances”
TMA	Trimetilamina
U	Umidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
V	Volume
Va	Volume da alíquota
VRBG	“Violet Red Bile Agar with Glucose”
WHO	World Health Organization

RESUMO

A população brasileira vem consumindo uma quantidade maior de camarão descascado porque o procedimento de remoção da casca é demorado. Além disso, com o aumento do consumo de pratos crus da comida japonesa utilizando esse tipo de camarão, há necessidade de adotar medidas que garantam sua qualidade porque ele facilmente sofre alterações bacteriológicas e físico-químicas. O principal ponto crítico de controle desse tipo de camarão é o descasque por promover o extravasamento do conteúdo intestinal e contaminação bacteriana da porção muscular. O objetivo desse trabalho de pesquisa foi avaliar a qualidade bacteriológica e físico-química de 60 amostras de camarões crus, descascados e resfriados de diversas espécies oferecidos aos consumidores em um mercado de peixe do Município de Niterói. Os resultados para análises de 60 amostras de camarão cru, descascado, resfriado foram 43,3% de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva; 70% de detecção de Bactérias do gênero *Salmonella* spp.; 100% de positividade na Contagem Total de Enterobactérias; 73,4% das amostras fora da temperatura ideal; 65% acima do limite preconizado de Bases Voláteis Totais (BVT); 83,3% com pH acima do ideal; na Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), obteve-se resultados com intervalos máximos de 5-10mg/100g para Histamina, >10 mg/100g para Cadaverina e ~5 mg/100g Putrescina; 100% das análises de Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico com valores até 3,0 mg de malonaldeído/Kg e na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), intervalo de 2,06 a 18,49 mg de histamina/100g. Há necessidade de um maior controle e monitorização da temperatura do camarão descascado resfriado desde sua captura até o momento de comercialização, para que essa matéria prima apresente boa qualidade e não represente perigo de infecção/intoxicação ao consumidor. De modo geral, a qualidade do camarão disponível ao consumo apresentou-se insatisfatória, em função do percentual de amostras que mostraram não conformidade com os padrões oficiais para alguns parâmetros e pela presença de ranço e histamina, que além de sugerirem perda de qualidade do produto, podem comprometer a saúde do consumidor.

Palavras-chave: camarão descascado, bactérias, histamina.

ABSTRACT

Brazilian population is consuming a larger amount of peeled shrimp because the procedure of removal of the shell is time-consuming. Moreover, with increased consumption of raw dishes of Japanese food using this kind of shrimp, there is need to adopt measures to ensure their quality because it easily undergoes changes bacteriological and physical-chemical properties. The main critical control point of this kind of shelling the shrimp is to promote the leakage of intestinal contents and bacterial contamination of the muscular portion. The main goal of this research was to evaluate the bacteriological quality and physical chemistry of 60 samples of raw shrimp, peeled and cooled several species offered to consumers in a fish market in the city of Niterói. The results for the analysis of 60 samples of raw shrimp, peeled, cooled, 43.3% of bacteria were *Staphylococcus* Coagulase Positive and 70% detection of bacteria of the genus *Salmonella* spp. 100% positivity in the total count of Enterobacteria; 73.4 % of the samples outside the ideal temperature, 65% above the recommended limit of Total Volatile Bases (TVB), 83.3% with a pH above the ideal in the Assessment of Production of Histamine, Putrescine and Cadaverine by Method of Thin Layer Chromatography (TLC), we obtained results with maximum intervals of 5-10mg/100g to Histamine, > 10 mg/100 g for ~ 5 mg/100g Cadaverine and Putrescine, 100% of the analysis of Thiobarbituric Acid Reactive Substances values up to 3.0 mg malonaldehyde / kg and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), range from 2.06 to 18.49 mg histamina/100g. There is a need for greater control and monitoring the temperature of the peeled shrimp cold since his arrest until the time of marketing, raw material for this present good quality and no risk of infection / intoxication to the consumer. Overall, the quality of shrimp available to the consumer had to be unsatisfactory, based on the percentage of samples that showed non-compliance with official standards for some parameters and the presence of histamine and rancidity, and suggest that loss of product quality may compromise the consumer's health.

Keywords: peeled shrimp, bacteria, histamine.

1 INTRODUÇÃO

Enquanto a demanda de produtos oriundos da pesca vem aumentando em todo o mundo, em função da conscientização por parte dos consumidores e dos benefícios nutricionais do pescado, a disponibilidade de produtos seguros, sob o aspecto de conservação, não acompanha tal crescimento, sendo necessária a implementação de práticas de conservação aliadas a fatores que garantam a estabilidade do produto.

O camarão é um alimento que pode ser consumido *in natura*, desta forma, o risco de contaminação por parte do consumidor aumenta muito quando comparado a gêneros alimentícios que foram submetidos a algum tipo de tratamento anterior ao consumo.

Os camarões descascados comercializado no Estado do Rio de Janeiro são o *Litopenaeus vannamei* (camarão cinza), o *Xiphopenaeus kroyeri* (camarão sete-barbas). Este camarão é nativo do Pacífico leste, trazido para o Brasil em 1981 para fins comerciais (TAVARES; MENDONÇA, 2004). O *Litopenaeus vannamei*, conhecido como camarão-vanamei ou camarão-cinza, corresponde a 95% da produção brasileira de camarões marinhos, sendo cultivado em vários estados do nordeste (Piauí, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Sergipe e Bahia), do norte (Pará), do sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo) e sul (Paraná e Santa Catarina). Esta espécie é sensível a diversas doenças de origem viral, constituindo um sério risco de contaminação às espécies nativas (CASSAROLA et al., 2004).

Como os outros produtos pesqueiros, o camarão é um produto altamente susceptível à deterioração, fator agravado pela possibilidade de oxidação de certas

substâncias do tipo amino-fenol, frequentemente atribuídas ao desdobramento de proteínas pela ação bacteriana.

Os padrões de qualidade e higiene atuais exigem que os alimentos, além de serem nutritivos e atraentes, sejam também saudáveis, isentos de agentes infecciosos e de substâncias tóxicas produzidas pelo crescimento de bactérias e fungos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade bacteriológica e físico-química dos camarões crus, descascados e resfriados comercializados em um mercado de peixe do Município de Niterói.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERFIL DA CARCINICULTURA NO BRASIL E NO MUNDO

Segundo a “Food and Agriculture Organization” (FAO, 2006), no ano de 2005, a produção mundial de camarão chegou a 6 milhões de toneladas, sendo que a captura, proveniente do extrativismo, foi de aproximadamente 3,42 milhões de toneladas. Em 2005, o Brasil foi o 6º exportador mundial deste crustáceo e, de 2003 à 2006, representou cerca de 52,5% do total das exportações de pescado (RIECHE; MORAES, 2006). Entre 2005 e 2007, a produção ficou na média de 65 mil toneladas e, a partir de 2008, quando chegou a 70 mil toneladas e a um faturamento de R\$ 300 milhões, ensaiou uma recuperação que pôde ser alavancada pelas exportações, especialmente para a Europa (ABCC, 2010).

No ano de 2008, exportou-se 30% da produção, mas em 2009 as vendas externas levaram 50% do que foi produzido (RAMOS, 2009).

A produção mundial de camarões cultivados e capturados, em 2008, foi da ordem de 6,519 milhões de toneladas, das quais 52,13% vieram dos cultivos (FAO, 2010). A produção extrativa mundial de camarão atingiu o seu limite sustentável, só podendo então a crescente demanda mundial por esse produto ser suprida através da produção oriunda do cultivo (FAO, 2009). A carcinicultura sofreu um incremento médio anual de 13,18% ao ano entre 1998 e 2008, enquanto que a produção extrativa desse produto cresceu apenas 1,57% ao ano no mesmo período segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2010).

No Brasil, o desenvolvimento da carcinicultura se deu a partir da introdução do *L. vannamei* de acordo com dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2004). Essa espécie tem como característica a adaptação às mais

variadas condições de cultivo, suportando águas hiper e oligohalinas, como também grandes variações de temperatura (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002).

A carcinicultura se encontra em um momento de aprimoramento através de propostas de Redes Temáticas para o desenvolvimento de projetos de pesquisa científica, tecnológica e inovação nesse setor. As Redes englobam o melhoramento genético; o manejo de cultivo; a qualidade da água, do sedimento, do solo e do tratamento de efluentes; itens de sanidade; estudos nutricionais; valor agregado e Gestão de Pesquisa e Estruturação (FERNANDES, 2010).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CAMARÃO

O camarão marinho *L. vannamei*, está naturalmente distribuído ao longo da costa leste do Oceano Pacífico, desde o sul do México até o norte da Colômbia (LUVESUTO et al., 2007), é uma espécie de peneídeo que se tornou bem conhecida e aceita no mercado internacional por sua importância para a aquicultura e pela excelente qualidade de sua carne (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002).

O camarão é um produto altamente perecível devido ao seu elevado teor de proteínas, compostos nitrogenados não protéicos, aminoácidos livres e elevada atividade de água. Por ser rico em proteínas, é susceptível a ação autolítica das enzimas proteolíticas musculares e/ou a deterioração microbiana (BRAGA et al., 2000; SIQUEIRA, 2001). As enzimas proteolíticas presentes no suco gástrico e nos tecidos do camarão provocam a decomposição, propiciando a disseminação de microrganismos endógenos (BRANDÃO, 2007). Além da microbiota normal, os microrganismos contaminantes podem ser incorporados durante a captura e, principalmente, na sua manipulação (BRAGA et al., 2000; JAY, 2005a).

A composição centesimal média dos camarões se aproxima à de qualquer pescado: 78-84% de água e 18-20% de proteínas de acordo com espécie, estado sexual, muda, entre outros fatores, mas sempre com um baixo conteúdo de gordura (em média 2%). Como a análise centesimal isoladamente não explica sua tão fácil deterioração, esta pode ser justificada pelos componentes minoritários, como Óxido de Trimetilamina (OTMA) que é degradado a trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA) e formaldeído, aminoácidos livres, glicose, ribose, mono, di e trifosfato de adenosina associados a uma larga série de nucleotídeos, que contribuem para seu

excelente sabor mas, que ao mesmo tempo, é o substrato ideal para o crescimento microbiano (MARCOS; MAQUEDA, 2003; YAMAGATA; LOW, 1995).

Pedrosa e Cozzolino (2001) encontraram valores para a composição centesimal do camarão cru (Natal-RN) com obtenção dos seguintes resultados: umidade (88,34 g%); proteínas (10,62±0,09 g%); lipídeos (0,36±0,03 g%); cinzas (1,05±0,01 g%), calorias (45,72 Kcal), zinco (0,46±0,00 mg%); ferro (1,16±0,15 mg%) e cobre (0,19±0,001 mg%) (PEDROSA; COZZOLINO, 2001).

2.3 QUALIDADE E DETERIORAÇÃO DO PESCADO RESFRIADO

Após a captura do pescado, vários eventos bioquímicos ocorrem até o aparecimento dos primeiros sinais de deterioração, podendo ser classificados como metabólicos e microbianos. Os eventos bioquímicos metabólicos ocorrem devido à atividade de enzimas que permanecem viáveis, mesmo após a morte do animal. Um dos primeiros produtos a ser formado a partir das alterações enzimáticas é o ácido láctico, que é proveniente da conversão do glicogênio armazenado na musculatura do camarão. Seu acúmulo no organismo faz com que haja a queda do pH, com liberação e ativação de proteases e catepsinas, resultando em proteólise com liberação de aminoácidos livres que poderão ser utilizados pelas bactérias. A degradação microbiana de aminoácidos pode produzir bases voláteis como amônia, cujos níveis estão relacionados com a quantidade de ATP inicial na musculatura, além de produzir aminas biogênicas como histamina, cadaverina e putrescina. A degradação de nucleotídeos também começa logo após a morte do peixe e resulta na formação da hipoxantina. Simultaneamente, o OTMA e o ácido láctico podem ser metabolizados pela ação bacteriana formando o TMA e o ácido acético. Todas essas substâncias, formadas pela ação microbiana, podem ser utilizadas para análises químicas de determinação da deterioração do produto (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994; JACOBBER; RAND, 1982).

Dentre as bactérias que concorrem para o processo de deterioração do pescado, podem ser citados os gêneros *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Serratia* e *Bacillus* (SALES, 1988), também podem ser encontradas outras bactérias como os coliformes, clostrídeos, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e víbrios, podendo os mesmos estar relacionados à matéria-prima, o

ambiente ou, ainda, se originar do manuseio e/ou estocagem incorretas, durante o processamento e a comercialização (HOFFMAN, 1999).

Um fator importante apresentado pelo pescado fresco é a sua extrema perecibilidade, dessa forma são susceptíveis, sobretudo, à autólise e à deterioração microbiana durante o processamento e armazenamento (ANIHOVI et al., 2007). Alimentos frescos podem ser veículo para a transmissão de bactérias capazes de causar doença em humanos (ABADIAS et al., 2008).

2.3.1 Parâmetros Bacteriológicos de Qualidade

O pescado pode ser veiculador de uma gama enorme de microrganismos patogênicos para o homem, sendo a maior parte fruto da contaminação ambiental. O lançamento dos esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e no próprio mar é a causa poluidora mais comum registrada no mundo inteiro (CONSTANTINIDO, 1994). No caso particular da pesca marítima, a captura em águas costeiras oferece maiores riscos do que a realizada em alto mar (LIMA, 1997).

Outra fonte de contaminação importante é o manejo do pescado, desde o momento da captura, ainda nos barcos pesqueiros (ZICAN, 1994), até sua destinação final; após passar por inúmeras fases de processamento e transporte (CARDONHA et al., 1994).

Os fatores intrínsecos relacionados a este produto, juntamente com a falta de condições higiênicas que vão desde a captura até o beneficiamento, somados a temperaturas inadequadas durante armazenamento, transporte e comercialização são fatores que favorecem sua deterioração (BRANDÃO, 2007; JAY, 2005a).

Os membros participantes da Comissão do *Codex Alimentarius* dispõem de uma revisão do Código de Práticas para Produtos Pesqueiros que inclui os produtos da aquicultura. Segundo recomendações destes, há necessidade de uma atenção especial no controle de agentes patogênicos biológicos, como as bactérias (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp.) e parasitas (*Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis* spp), contaminantes químicos (metais pesados, pesticidas, reagentes químicos industriais) e resíduos de medicamentos veterinários (antimicrobianos, parasiticidas) (BEIRÃO et al., 2000).

Além das perdas econômicas, o desenvolvimento microbiano poderá levar à produção de aminas biogênicas, a exemplo, da histamina e tornar o alimento impróprio para consumo (SOCCOL, 2002).

A intoxicação alimentar por histamina é conhecida como “intoxicação escombróide” e tem sido observada após o consumo de pescado com altos teores desta amina – acima de 10mg/100g (DU et al., 2002; EMBORG et al., 2005; SILVEIRA, 2002; YOKOYAMA, 2007). A produção de histamina é devida principalmente a um processo de descarboxilação de histidina livre pela ação da enzima exógena histidina descarboxilase (LEHANE, 2000; TSAI et al., 2007). No entanto, é essencial destacar que o processo de descarboxilação da histidina se deve à atividade de várias espécies bacterianas presentes no pescado, uma vez que esta enzima não está presente naturalmente nos tecidos dos mesmos (EMBORG et al., 2005; KUNG et al., 2007; LEHANE, 2000; TSAI et al., 2007). Verifica-se, ainda, que pescado contendo níveis expressivos de histamina nem sempre evidenciam sinais aparentes de deterioração, porém seu efeito tóxico pode causar sérios danos à saúde do consumidor (MORENO et al., 2003; SILVEIRA, 2002).

Deste modo, o teor de histamina é considerado um parâmetro ou índice de qualidade de alimentos, pois infere nas condições higiênico-sanitárias dos produtos marinhos (DU et al., 2002; MORENO et al., 2003). A ingestão de alimentos com níveis de histamina em concentrações acima de 10mg/100g de alimento confere risco à saúde pública (GERMANO et al., 1993; MORENO et al., 2003; SILVEIRA et al., 2001). As propriedades psicoativas e vasoativas de algumas aminas biogênicas, especialmente histamina, provocam efeitos tóxicos e farmacológicos (MOURÃO et al., 2007). O processo patológico da intoxicação por histamina caracteriza-se por um período curto de incubação e duração. Os sintomas mais frequentes são os cardiovasculares, principalmente palpitações, urticárias, eritemas na face e região do pescoço, disfagia, podendo ocorrer choque anafilático; os gastrointestinais, que incluem dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia e os neurológicos com dores e inchaços relacionados às urticárias e formigamento na língua (LIMA; GLÓRIA, 1999; SILVEIRA et al., 2001; SILVEIRA, 2002).

Observa-se que na maioria dos estudos referentes à ocorrência de histamina em camarão há relatos de espécies de bactérias mesófilas e psicrófilas (LAKSHMANAN, 2002; TSAI et al., 2005). Bactérias da família Enterobacteriaceae são as mais ativas no processo de descarboxilação da histidina, destacando-se as

espécies *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei* e os gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Clostridium* (EMBORG et al., 2005; MAVROMATIS; QUANTICK, 2002; SILVEIRA et al., 2001; TSAI et al., 2005).

Dentre os microrganismos patogênicos mais importantes, destacam-se os do gênero *Vibrio*. *V. parahaemolyticus* é usual na água do mar, principalmente ao nível das regiões costeiras e pode estar associado a processos infecciosos do pescado (LIMA, 1997), afetando em particular as criações de camarão marinho (PAREDES, 1993). Em humanos, causa gastroenterite aguda caracterizada por quadro disentérico, principalmente após consumo de peixe *in natura*, mariscos, camarões e ostras (LIMA, 1997). Inúmeros casos, com isolamento do agente foram registrados nas regiões litorâneas do sul de São Paulo, Cananéia, do norte do Paraná e nas zonas de pesca da Grande Florianópolis (GERMANO et al., 1993).

V. cholerae, de origem humana, atinge as águas do mar, rios e lagos através do despejo de esgotos e do ponto de vista de saúde pública é de suma importância, pois, além de ser responsável por verdadeiras pandemias, pode se apresentar com mortalidade elevada, na dependência da população acometida (DONINI et al., 1993).

Merecem também destaque as bactérias do gênero *Salmonella* (NUNES, 1994), tanto as de origem humana, *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, quanto as de origem animal, bem como as *Shigella* spp., todas elas encontradas em águas poluídas por esgotos ou por excretas animais (GERMANO et al., 1993).

Como consequência direta da manipulação inadequada, são apontados os *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* (ADAMS et al., 1994; CARDONHA et al., 1994; GERMANO et al., 1993), ambos de origem humana, encontrados nas mucosas e superfície da pele e que encontram no pescado ambiente favorável para a sua multiplicação.

Os manipuladores de alimentos portadores de *Staphylococcus aureus* são importantes fontes de contaminação dos alimentos (HOLT et al., 1994). Neste contexto, o aquecimento do alimento após sua manipulação torna-se relevante na prevenção de toxinfecções, contudo a toxina do *S. aureus* é termorresistente. Por isso, os cuidados como a refrigeração devem ser tomados após o aquecimento, caso contrário, o microrganismo poderá multiplicar-se e produzir toxina (MOTTA; BELMONT, 2000).

Outro microrganismo importante é *Proteus morganii*, que integra 0,1% a 1% de toda a flora superficial do pescado (GERMANO et al., 1993). A contaminação por essa bactéria pode levar à formação de histamina, por descarboxilação da histamina. A ingestão de pescado nestas condições pode resultar em intoxicação com sintomas nervosos dada a estimulação vagal, a partir da ingestão de 100mg de histamina/100g de peixe (ADAMS et al., 1994; GERMANO et al., 1993).

Inúmeros agentes bacterianos podem, ainda, contaminar o pescado e causar riscos à saúde. Assim, cepas psicrótróficas de *Bacillus cereus* produzem enterotoxina nos preparados de peixe, sobretudo em pH superior a 6,0, acarretando surtos caracterizados por diarreia (GERMANO et al., 1993). *Clostridium perfringens* tipo C pode causar enterite necrótica. Clostrídios sulfito redutores, *Klebsyela* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Yersinia* enterocolítica, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Enterococcus* spp. e Coliformes Fecais ou Coliformes Termotolerantes podem ser encontrados nos peixes frescos ou congelados, nos frutos do mar e nos produtos industrializados (CARDONHA et al., 1994; GERMANO et al., 1993; NUNES, 1994).

A falta de práticas de higiene dos manipuladores de alimentos, equipamentos e a forma de estocagem propiciam a contaminação dos produtos. Esta contaminação pode se dar de diversas formas e resulta na deterioração e na possível inoculação de patógenos nos alimentos a serem consumidos (DUARTE et al., 2010; SHOJAEI, 2006).

Segundo FDA (2001), a histamina é formada em consequência do abuso do binômio tempo/temperatura em certas espécies de pescado, ou seja, quando o pescado é exposto a altas temperaturas por muito tempo. As bactérias formadoras de histamina são capazes de crescer e de produzir a histamina sob uma larga escala de temperatura.

2.3.1.1 *Staphylococcus* Coagulase Positiva

Bactérias pertencentes à família *Staphylococaceae*, Cocos Gram-positivos, não formadores de esporos e imóveis, Podem se apresentar isolados, em grupos de duas, quatro ou, mais comumente, em grupos maiores em forma de “cachos de uva”, aeróbios facultativos, com maior crescimento em aerobiose (HOLT et al., 2008). São mesofílicas, podendo crescer em temperaturas entre 7 e 48°C, sendo a temperatura

ótima de 37°C. Crescem em faixa de pH entre 4,0 e 9,3, com faixa de pH ótima entre 7,0 e 7,5. A atividade de água mínima necessária para seu desenvolvimento é 0,83 (WHO, 2008). São halotolerantes, podendo resistir a concentrações de 10 a 20% de NaCl presente em alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Produzem enterotoxinas (também produzidas por *S. intermedius* e *S. hyicus*) em temperaturas entre 10 e 46°C, com ótimo entre 40 e 45°C, porém é mínima em pH menor que 6 e nula em atividade de água menor que 0,86 (WHO, 2008).

O gênero *Staphylococcus* é formado por 41 espécies e 24 subespécies (EUZÉBY, 2009). Entre as bactérias desse gênero, *S. aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar em razão da sua capacidade de produzir enterotoxinas (EE); vinte e duas EE já foram descritas e 10 foram envolvidas com intoxicação alimentar (EEA, EEB, EEC1, EEC2, EEC3, EED, EEE, EEG, EEH e EEI) (CENCI-GOGA et al., 2003).

Possui distribuição ubiqüitário, ou seja, está em toda a parte: ar, poeira, esgoto, água, leite, alimentos, superfícies expostas ao ambiente, pele e mucosas dos seres humanos e os animais; os últimos os principais reservatórios (FORSYTHE, 2002). Na água do mar, a estabilidade do gênero e a habilidade de adaptação a diferentes ambientes ainda não se encontram bem definidos (VIEIRA, 2004).

Staphylococcus spp. não são bons competidores com outras bactérias, assim, raramente causam doença alimentar após ingestão de produtos crus. O organismo é inativado rapidamente pelo calor, mas é resistente a secagem e tolerante a altas concentrações de sal (FORSYTHE, 2002).

S. aureus crescem em meios sem sal, porém são capazes de se multiplicar em concentrações de 7 a 10% de NaCl e algumas linhagens podem crescer até 20% de NaCl, dependendo de outros parâmetros como temperatura, pH, atividade de água (Aa) e potencial de oxi-redução (O/R). Em relação ao pH, o *S. aureus* pode se multiplicar na faixa entre 4,0 e 9,8 sendo ótima entre 6,0 e 7,0 (JAY, 2005b).

Apresenta resistência ao estresse ambiental, fator que potencializa sua patogenicidade e possibilita sua sobrevivência em alimentos de origem marinha (BEIRÃO et al., 2000).

Staphylococcus spp. é dividido em dois grupos de acordo com sua capacidade de produzir uma enzima denominada coagulase; o primeiro grupo é capaz de coagular tanto o plasma de sangue humano como o de coelho, bem como

o plasma de outras espécies animais, embora em graus variados, mesmo na presença de anticoagulantes, tratando-se de *Staphylococcus* coagulase positiva; esta propriedade é importante marcador de patogenicidade. O segundo grupo, está o *Staphylococcus* coagulase negativa, que não coagula o plasma. Trata-se de uma espécie comensal da pele e responsável por infecções hospitalares (VIEIRA, 2004).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham enterotoxinas é provocada apenas por algumas espécies de estafilococos que geralmente são coagulase e termonuclease positivos (JAY, 2005b).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das intoxicações alimentares mais frequentes. É decorrente da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento contaminado pela bactéria. O alimento contaminado sem refrigeração adequada propicia o crescimento microbiano com produção de toxinas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Os sintomas consistem em náuseas, vômitos, diarréias, dores abdominais, dor de cabeça, sudorese, prostração e sede e aparecem geralmente dentro de quatro horas após a ingestão do alimento contaminado (JAY, 2005b; RIEDEL, 1992; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). O vômito geralmente vem antes da diarréia (VIEIRA, 2004). O quadro clínico normalmente é de curta duração (média de 24h), podendo se estender por até três dias, quando o período de incubação é curto. O restabelecimento é rápido (um a cinco dias), em geral, e a mortalidade é baixa (RIEDEL, 1992).

Podem ser destruídos pelo calor, porém sua toxina enterotóxica é termorresistente (RIEDEL, 1992). Uma dose de toxina menor que 1,0µg/Kg (300 a 500ng) em alimentos contaminados produzirá sintomas de toxiose por estafilococos. Esta quantidade de toxina é produzida quando a contagem de células está acima de 10^5 por grama de alimento (BALABAN, RASOOLY, 2000; FORSYTHE, 2002).

Os fatores mais frequentemente associados a surtos por ingestão de alimento contaminado por enterotoxinas são, refrigeração inadequada, alimento preparado com muita antecedência, falhas na higiene de manipuladores infectados, cozimento ou processamento inadequado e alimentos mantidos sob aquecimento em temperaturas que favorecem o crescimento microbiano (JAY, 2005b).

No período de 1987 a 1996, a presença de *S. aureus* foi relatada em 958 casos e 43 surtos ocorridos no Japão, envolvendo pescado e frutos do mar; na

Inglaterra, de 359 surtos de intoxicação alimentar e casos esporádicos por *S. aureus*, apenas 7% foi proveniente de pescado (VIEIRA, 2004).

Espécies de estafilococos coagulase negativas são capazes de produzir enterotoxinas, mas quando produzem nuclease são termossensíveis. A prática de pesquisa de estafilococos coagulase positiva em alimentos leva a estimativas inferiores à real prevalência de linhagens produtoras de enterotoxinas (JAY, 2005b).

Em Florianópolis, foram analisadas 175 amostras de pescado (60% de carne de molusco) e em 20% foi identificada a presença de *S. aureus* (AYULO et al., 1994).

O padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) é de, no máximo, 10^3 UFC/g de crustáceos *in natura* resfriados.

2.3.1.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é considerado por muitos autores como um dos patógenos mais importantes causadores de surtos de infecções alimentares em todo o mundo. Seu estudo tem grande importância para a saúde coletiva pelo fato de causar uma enfermidade de difícil controle, em virtude de se apresentar distribuído amplamente na natureza, possuir uma grande variedade de reservatórios, ser extremamente patogênico para o homem e para muitas espécies animais e ter sua disseminação favorecida por indivíduos portadores assintomáticos (BERSOT, 2006).

Salmonella spp. é um importante patógeno que pode ser transmitido tanto por humanos como por animais. Pode ser encontrada em águas marinhas altamente poluídas e o pescado após análise bacteriológica, pode apresentar resultado positivo até 30 dias após a contaminação inicial (MOLINS, 2001).

Apresenta-se como bastonetes curtos Gram-negativos não formadores de esporos e são fermentadores de glicose, produzindo ácido e gás. Somente duas espécies são móveis, com flagelos peritríquios. Infectam o homem e a maioria dos animais domésticos e selvagens; quando estão presentes em ambientes, água potável e alimentos, deve-se à contaminação por fezes de indivíduos portadores. No homem causa gastroenterite e febre tifóide (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005b; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* com 0,7 a 1,5 μm de diâmetro e 2,0 a 5,0 μm de comprimento, não formadoras de esporos e usualmente

móveis através de flagelos peritríquios, anaeróbios facultativos. Geralmente, formam colônias com 2-4 mm de diâmetro (GARRITY, 2005).

São mesofílicas, crescendo em temperaturas de 5 a 47°C (ótima: 37°C). Crescem em pH maior que 4,9 (*Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi*) ou maior que 4,0 (outras espécies de *Salmonella* spp. causadoras de doenças veiculadas por alimentos). A atividade mínima de água necessária para o seu crescimento é de 0,95 (WHO, 2008).

O gênero *Salmonella* está agrupado em apenas duas espécies, *S. enterica* e a *S. bongori* que são divididos em cinco subespécies sendo mais de 2000 sorovares no total e a maioria classificada como *S. enterica* (JAY, 2005b).

Salmonelas são bastante resistentes ao calor, à desidratação e se multiplicam em baixas temperaturas (RIEDEL, 1992). A temperatura ótima para crescimento é de 37°C e a mínima é de cerca de 5°C, como não formam esporos, são relativamente termossensíveis podendo ser destruídas a 60°C por 15-20 min. (FORSYTHE, 2002).

O *habitat* primário da *Salmonella* spp. é o trato intestinal dos animais, porém pode ser encontrada em outras partes do corpo. Como forma intestinal é excretada nas fezes, pode ser encontrada, também, em águas poluídas. Ao consumir água e/ou alimento contaminado(s), a pessoa infectada novamente elimina bactérias pelas fezes formando um ciclo. Um animal ou pessoa pode ser portador quando excreta frequentemente *Salmonella* spp. em suas fezes sem apresentar qualquer sinal ou sintoma da doença (JAY, 2005).

Salmonella spp. já foi isolada de alimentos de variadas composições. No entanto, é mais comumente isolada de carne bovina, ovos e carne de aves, especialmente carne de frango. As infecções humanas geralmente estão associadas ao consumo de carne de frango ou de ovos mal cozidos ou indevidamente manipulados, de forma a permitir a multiplicação de *Salmonella* spp. no alimento (CAMPOS, 2005; OPS, 2003). Em sua pesquisa, Koonse et al. (2005) relatam o isolamento deste microrganismo em camarões de carcinicultura.

Infecções alimentares causadas por *Salmonella* spp. têm o período de incubação longo de 12 a 72 horas por se tratar de uma infecção e duração de 1 a 7 dias; os sintomas são: diarreia, cólicas intestinais e com certa frequência, febre, náuseas e vômitos. Náuseas e vômitos não são intensos e ausentes na maioria das

vezes. A taxa de mortalidade de salmonelose é menor que 1% (FORSYTHE, 2002; RIEDEL, 1992).

A manipulação inadequada do alimento pronto para o consumo pode permitir a multiplicação de *Salmonella* spp. em níveis passíveis de ocasionar surtos de infecção alimentar (GAST, 2003), os quais podem advir ainda do contato do produto pronto com alimento cru ou por meio do consumo da carne ou alimento mal cozidos, da manutenção do alimento por muitas horas fora de refrigeração e do aquecimento inadequado antes de servi-lo (OPS, 2003). A questão da refrigeração já tinha sido descrita por Mesquita et al. (1997) que observaram a contaminação com bactérias potencialmente patogênicas como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* spp. devido a procedimentos insatisfatórios de armazenamento.

Dados epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), sobre surtos ocorridos no Brasil entre 1999 e 2008, mostram que ocorreram 6.062 surtos de doenças transmitidas pela ingestão de alimentos, com 117.330 doentes e 64 mortes. A maioria dos surtos registrados foi causada por *Salmonella* spp. e os Estados com maior ocorrência de surtos foram o Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná. No entanto, os números não traduzem a real situação em todas as Unidades Federativas, pois as notificações se concentram nos Estados onde a Vigilância Epidemiológica das DTAs está melhor implantada, ou seja, nos Estados do Sul e Sudeste (BRASIL, 2008).

Os sintomas da Salmonelose no homem são inespecíficos e surgem em 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado e geralmente são caracterizados por náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaléia, calafrios e diarreia. Os sintomas podem ser acompanhados por fraqueza, fadiga muscular e febre. A taxa de mortalidade, em média, é de 4,1%, sendo de 5,8 durante o primeiro ano de vida e 15% em pessoas acima de 50 anos (JAY, 2005b). A Salmonelose geralmente tem cura espontânea e a recuperação clínica se dá em até quatro dias, no entanto, o indivíduo portador convalescente pode eliminar a bactéria por semanas ou até por alguns meses (OPS, 2003).

Pacientes imunocomprometidos, idosos e crianças podem apresentar complicações graves da doença. Tavechio et al. (1996) avaliaram isolamentos de *S. Enteritidis* realizados entre 1991 e 1995 de infecções humanas e amostras não humanas e verificaram um aumento significativo no ano de 1993 relacionado, entre outras coisas, a hemoculturas de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência

Adquirida (SIDA). Diante disso, afirmaram que a septicemia é uma complicação comum e crescente nesses pacientes e atentaram para o desafio do tratamento da salmonelose.

O tratamento no homem com antimicrobianos geralmente não é indicado, pois prolonga o período de eliminação da bactéria pelas fezes e pode determinar o aparecimento de cepas multirresistentes. Contudo, o tratamento pode ser indicado nos casos de salmoneloses com complicações sistêmicas e na febre tifóide (CAMPOS, 2005).

Os sorotipos adaptados ao ser humano são *S. Typhi* e *S. Paratyphi A, B e C* (CAMPOS, 2005) e causam a febre tifóide e a febre entérica, respectivamente (SHINOHARA et al., 2008). Estima-se que ocorram 21 milhões de casos e 200 mil mortes por ano em decorrência de febre tifóide em todo o mundo (CDC, 2005). A ocorrência desta doença se deve principalmente a situações precárias de saneamento, higiene pessoal e ambiental, por isso, a febre tifóide praticamente inexistente em países onde estes problemas foram superados (BRASIL, 2005). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, no Brasil (BRASIL, 2005), a doença ocorre sob a forma endêmica, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, devido às condições de vida de grande parte da população, mas tende a haver uma redução no número de casos. No entanto, a sub notificação prejudica a veracidade dos dados epidemiológicos, pois dentre outros motivos, muitos casos não são diagnosticados e casos suspeitos não são conhecidos (SHINOHARA et al., 2008).

O padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) é de ausência em 25g de crustáceos *in natura* resfriados.

2.3.1.3 Enterobacteriáceas

Van et al. (2008) afirmam que doenças causadas por alimentos são provocadas principalmente por bactérias, vírus, parasitas e produtos químicos. Constituem uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No entanto, a infecção sistêmica e, conseqüentemente a morte, pode ocorrer, especialmente em grupos vulneráveis com imunidade diminuída, como idosos e crianças. As bactérias são provavelmente a causa mais comum dessas doenças.

São características dos membros da família *Enterobacteriaceae* se apresentarem em forma de bacilos Gram-negativos, em geral é de 0,3 a 1,8 μm o seu comprimento. Estes microrganismos podem ser imóveis ou móveis. Deste último são por meio de flagelos peritríquios. São anaeróbios facultativos e quimiorganotróficos, tendo tanto o metabolismo aeróbico como o fermentativo. A maioria das espécies se desenvolve bem a temperatura de 37°C, entretanto algumas têm temperatura ótima entre 25 e 30°C e são frequentemente mais ativas metabolicamente a estas temperaturas. Existem gêneros psicotróficos frequentemente encontrados no solo, água e trato gastrointestinal dos seres humanos e animais (HOLT et al., 1994; ICMSF, 2000).

A definição individual de cada gênero da família *Enterobacteriaceae* é quase impossível. Para o diagnóstico laboratorial de identificação em espécie desta família, faz-se uso de algumas baterias de provas bioquímicas para cada um dos mais de 115 nomes de espécies e subespécies já identificadas. Se um organismo não é identificado com certeza, testes adicionais estão disponíveis para diferenciar estas espécies, subespécies ou gêneros (HOLT et al., 1994).

As enterobactérias catabolizam D-glicose e outros carboidratos com produção de ácido, muitas espécies, também com produção de gás. São oxidase negativo e catalase positivo, exceto *Shigella dysenteriae* O grupo 1 e espécies de *Xenorhabdus*. São amplamente distribuídas podendo também ser encontradas no solo, água, frutas, vegetais, animais e nos seres humanos. Há uma grande heterogeneidade na ecologia e hospedeiros, sendo potencialmente patogênicas para os seres humanos, animais e insetos. Inúmeras espécies causam doenças diarréicas incluindo febre tifóide e disenteria bacilar. Muitas espécies que não estão associadas com doenças diarréicas são frequentemente referenciadas como patógenos oportunistas. Muitas dessas espécies, assim como as que causam doenças diarréicas, podem causar uma variedade de infecções extraintestinais incluindo bacteremia, meningite, feridas e infecções do trato respiratório e urinário. As enterobactérias são responsáveis por 50% de infecções nosocomiais, mais frequentemente causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* e *Serratia* (HOLT et al., 1994).

Escherichia coli biotipo I é a mais predominante enterobactéria encontrada (COX; MERCURI, 1978; NG; STILES, 1978).

A fonte de enterobactérias frequentemente está associada com a manipulação e superfícies de trabalho. Um total de 2.343 cepas de Enterobacteriáceas foram isoladas e identificadas em amostras de carne e superfícies de trabalho com facilidade. *E. coli* biotipo I e *Serratia liquefaciens* foram isoladas de todos os estágios de manipulação da carne, indicando que podem estar presentes na carne e em toda parte do sistema de manipulação. *Enterobacter agglomerans* e *S. liquefaciens* foram as enterobactérias predominantes. *Klebsiella pneumoniae* também foi isolada com frequência (STILES; NG, 1981).

Microrganismos deteriorantes da família *Enterobacteriaceae* podem se multiplicar em proporções significativas quando estocados em temperaturas maiores que 10°C (PENNEY et al., 1993).

Certas espécies de enterobactérias psicrófilas comumente ocorrem na matéria prima refrigerada. Esses microrganismos, são capazes de se multiplicar aerobicamente no tecido adiposo e tecido muscular com pH maior que 6,0 (DAINTY; MACKEY, 1992; GRAU, 1981).

Seu desenvolvimento é favorecido em temperaturas maiores ou igual a 4°C (BLICKSTAD; MOLIN, 1983).

Em temperaturas acima de 5° C, enterobactérias geralmente predominam sobre *Pseudomonas* spp. e são responsáveis pela deterioração. Os principais gêneros da família *Enterobacteriaceae* apontados como deteriorantes de carne e produtos cárneos são *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Escherichia* e *Yersinia* (BRENNER, 1992).

A presença de enterobactérias é frequentemente usada como indicador para possível contaminação fecal decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento (TORNADIJO et al., 2001).

Muitos microrganismos desta família são de importância para a saúde pública. Dentre esses, destacam-se os tipicamente enteropatogênicos ao homem (*Salmonella* e *Shigella*) e outros que apresentam apenas alguns sorotipos enteropatogênicos como é o caso do gênero *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Yersinia* (HOLT et al., 1994).

2.3.1.3.1 Principais gêneros da família Enterobacteriaceae

***Citrobacter* spp.**

Ocorrem nas fezes de humanos e animais, provavelmente como habitantes anormais. Frequentemente isolado de espécimes clínicas como patógenos oportunistas. *Citrobacter diversus* pode causar meningite neonatal. Também encontrado no solo, água, esgoto e alimentos (HOLT et al., 1994).

***Edwardsiella* spp.**

São bastonetes pequenos, medindo em média 1 µm de diâmetro x 2-6 µm e são Gram-negativos. Geralmente são móveis por flagelos peritríquios (*E. ictaluri* é móvel a 25°C, mas não a 37°C). Apresentam temperatura ótima de crescimento de 37°C, exceto *E. ictaluri* que tem preferência por temperaturas mais baixas. Ocorrem mais frequentemente no intestino de animais de sangue frio como peixes e répteis e no ambiente destes, particularmente em águas doces, mas também ocorre em animais de sangue quente e seres humanos. Patogênico para enguias, bagre e outros animais, raramente é patógeno para seres humanos (HOLT et al., 1994).

Edwardsiella tarda é considerada como bactéria emergente para enfermidades transmitidas através de alimentos (DOYLE, 1994).

***Enterobacter* spp.**

São espécies amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos. Várias espécies, mais notavelmente *E. cloacae*, *Cronobacter sakazakii*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans* e *E. gergoviae* são patógenos oportunistas de queimaduras e feridas, causam também infecções do trato urinário e ocasionalmente septicemias e meningite (HOLT et al., 1994).

***Escherichia* spp.**

São bacilos Gram-negativos, apresentam de 1,1 a 1,5 µm x 2,0 a 6,0 µm podendo ocorrer em formas isoladas ou aos pares. Muitas cepas possuem cápsulas

ou microcápsulas. Geralmente são móveis por flagelos peritríquios ou então, são imóveis. São anaeróbicos facultativos. Ocorrem na microbiota normal de animais de sangue quente, e no caso de *E. blattae*, no intestino de baratas (HOLT et al.,1994).

As estirpes de *Escherichia coli* que produzem enterotoxinas e outros fatores de virulência, incluindo as invasivas e fatores de colonização, causam doenças diarréicas. *E. coli* é também a maior causa de infecções urinárias e nosocomiais incluindo septicemia e meningite. Outras espécies, exceto *E. blattae*, são raramente identificadas como patógenos oportunistas, usualmente associados com infecções de feridas (HOLT et al.,1994).

Hafnia spp.

Ocorrem nas fezes de humanos e animais incluindo pássaros, água de esgoto, solo, água e produtos de origem animal (FARMER, 2003). São patógenos oportunistas para o homem, usualmente no sangue, urina ou feridas infeccionadas em pacientes com estado de saúde debilitado ou imunodeprimidos (HOLT et al., 1994; JANDA; ABBOTT, 2006).

Klebsiella spp.

Ocorrem nas fezes de seres humanos e espécimes clínicas, solo, água, grãos, frutas e vegetais. *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e ocasionalmente outras espécies são patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário e outras infecções ao homem. Frequentemente causam infecções nosocomiais urológicas, neonatais, em pacientes geriátricos ou em tratamento intensivo (HOLT et al.,1994).

Proteus spp.

Ocorrem no intestino dos seres humanos e em um grande número de animais, em dejetos, solo e águas poluídas. Há relatos do isolamento de *P. myxofaciens* em larvas de insetos. Patógenos de humanos causam infecções no trato urinário, invasões secundárias, lesões septicêmicas, frequentemente em queimaduras de pacientes (HOLT et al., 1994).

Providencia spp.

Isolados de casos de diarreias em seres humanos, infecções do trato urinário, feridas, queimaduras e bacteremias e também foram isolados de pinguins. São patogênicos para os seres humanos (HOLT et al., 1994).

Salmonella spp.

As espécies de *Salmonella* spp. são agentes frequentes de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos. Por serem microrganismos entéricos, podem estar presentes no intestino de animais de sangue quente e, mais raramente, também nos de sangue frio (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Resistem bem às temperaturas de refrigeração, no entanto, o congelamento provoca uma redução significativa da população, mas nunca a destruição completa (GLEDEL, 1994; SILVA, 2000).

Em função de sua capacidade de disseminação no meio ambiente, podem ser isoladas de locais variados e diferentes (águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras, ovos, etc.) e, conseqüentemente, de diversas matérias primas alimentares. Podem ainda ser veiculadas pelo próprio ser humano, neste caso na condição de portador assintomático (JAKABI et al., 1999).

Salmonelas são causa de febre tifóide, infecções entéricas, gastroenterites e septicemias (HOLT et al., 1994).

Serratia spp.

Ocorrem em espécimes clínicas do ser humano, solo, água, superfícies de plantas e outros ambientes, trato digestivo de ratos e insetos. *S. marcescens* é um proeminente patógeno oportunista hospitalar, causa septicemia e doenças do trato urinário. Várias outras espécies podem estar envolvidas em bacteremias e podem ser isoladas de escarros sem significado clínico. Causam mastite em vacas e outras infecções animais (HOLT et al., 1994).

***Shigella* spp.**

Patógeno intestinal do homem e de outros primatas, causa de disenteria bacilar (HOLT et al., 1994).

***Yersinia* spp.**

A espécie *Yersinia pseudotuberculosis* é patogênica para muitos animais, causando adenite mesentérica, diarreia crônica e septicemias. *Y. enterocolitica* causa infecções similares aos animais e ao homem. Outras espécies são patógenos oportunistas ou não causam patologias ao homem (HOLT et al., 1994). *Y. enterocolitica* tem sua importância em alimentos por tratar-se de um microrganismo patogênico e que tem sua presença associada a alimentos e água contaminados. A capacidade deste microrganismo de multiplicação a temperaturas de refrigeração (4-7°C) faz com que sua presença em alimentos represente risco potencial para a saúde pública. (BHADURI et al., 1995). A manifestação clínica da infecção é distinta nas diferentes faixas etárias, predominando a enterocolite com diarreia (MURRAY et al., 1994). Segundo Jay (1992), os sorotipos de *Y. enterocolitica* que se apresentam mais frequentemente nas infecções humanas são: O:3; O:5, 27; O:8 e O:9.

O padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2003) para a maioria das Enterobacteriáceas é < 10 UFC/g ou mL.

2.3.2 Parâmetros Físico-Químicos de Qualidade

As reações *post mortem* podem ser classificadas de acordo com os metabólitos gerados como: modificações das propriedades físicas dos músculos, degradação dos carboidratos, degradação dos nucleotídeos e modificações das proteínas (CONTRERAS-GUSMÁN, 1994).

O baixo teor de tecido conjuntivo em pescado e a composição deste tecido, pobre em elastina, tornam o músculo bastante susceptível ao ataque enzimático (NETTO, 1984).

Kai e Moraes (1988) explicaram que, com a morte, os sistemas que controlam os processos vitais cessam, ocorrendo o chamado *rigor mortis*. Até o término do *rigor mortis* não se inicia a deterioração bacteriana, pois o pH durante a rigidez é

menos propício ao desenvolvimento bacteriano. Quanto mais tempo a rigidez for prolongada, maior será o período de conservação do pescado. O *rigor mortis* é abreviado pelo esgotamento de glicogênio na captura do pescado e temperaturas elevadas, sendo prolongado pela redução do pH e resfriamento.

Devido à parada da oxigenação após a captura do pescado, a glicogenólise ocorre por via anaeróbica com formação de ácido láctico. Este, se presente, em quantidade suficiente, acidifica o pH e, conseqüentemente, retarda a multiplicação microbiana. Geralmente o pH no final do *rigor mortis* se encontra entre 6,2 a 6,5, porém dependendo da espécie de pescado há uma variação nesses valores (PEDROSA-MENABRITO; REGENSTEIN, 1988).

Os eventos bioquímicos que se iniciam no fim do *rigor mortis* culminam com a deterioração do peixe, quando não há aceitação sensorial e nem sanitária. Na fase do pós-rigor, o maior evento bioquímico é a alteração do teor de nitrogênio não proteico (particularmente dos aminoácidos livres), produzindo amônia e outras bases voláteis totais, como trimetilamina (TMA), dimetilamina (DMA) e traços de monometilamina (MMA) e propilamina. A amônia formada nesta fase é oriunda da descarboxilação ou desaminação dos aminoácidos. O primeiro caso é consequência da ação de bactérias descarboxilase positivas (presentes na pele e no trato digestivo), que é muito intensa sob temperatura de 20°C e pH ácido. No segundo caso, há ação de bactérias anaeróbicas que realizam desaminação de aminoácidos livres (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

Segundo Oetterer (2008), o *rigor mortis* do pescado pode durar de 2 a 18 horas com um pico às seis horas, porém sua duração é variável e depende da espécie do pescado. O pós-rigor se instala a partir do momento em que a actomiosina é degradada por enzimas proteolíticas, sendo que a catepsina tem alta atividade. Há o amolecimento da carne e, com a degradação proteica, há formação de peptídeos e aminoácidos livres. Nesta fase, há a ação rápida dos microrganismos, com formação de substâncias nitrogenadas voláteis. O estado do peixe costuma ser crítico quando as bases nitrogenadas voláteis chegam a 10mg/100g.

Ao final do *rigor mortis*, ocorre a proteólise, ou seja, a ação de enzimas nas proteínas da carne, com desprendimento de metabólitos voláteis, como as bases nitrogenadas e a amônia, responsáveis pelo odor característico desta fase. Após

iniciar a autólise, a deterioração é rápida, pois as bactérias encontram excelente substrato para sua multiplicação (OETTERER, 2008).

A decomposição do ATP ocorre por ação enzimática, com a formação em cadeia dos seguintes metabólitos: adenosina difosfato, adenosina monofosfato, inosina monofosfato, inosina e hipoxantina. Após a formação da inosina, a carne do pescado se apresenta insípida e a formação da hipoxantina confere um sabor amargo (PEDROSA-MENABRITO; REGENSTEIN, 1988).

De acordo com Pereira et al. (2001), os compostos nitrogenados formados na deterioração do pescado são denominados bases voláteis totais, como Trimetilamina (TMA), Dimetilamina (DMA), amônia e outros.

No início do processo degenerativo, a base volátil mais representativa é a amônia, originária dos produtos da desaminação dos derivados do ATP. Posteriormente, a amônia, proveniente da degradação de outros compostos nitrogenados, como aminoácidos, juntamente com a trimetilamina, formada a partir do óxido de trimetilamina (OTMA), passam a se fazer presentes (OGAWA, MAIA, 1999).

A partir do pós-rigor a amônia gerada pela ação microbiana soma-se à produzida anteriormente e, por isso, seus níveis aumentam significativamente após a primeira semana de estocagem. Entretanto, devido a maior facilidade analítica, costuma-se determinar o nitrogênio volátil, em vez da amônia, através do teste de quantificação das bases voláteis totais (BVT) (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994).

Siqueira (2001) explicou que, devido ao acúmulo das bases voláteis no processo final da deterioração, os valores de pH do músculo do pescado aumentam de forma lenta logo após a captura e rapidamente na fase final. Porém, mudanças de pH devido à deterioração diferem marcadamente com a variedade do pescado e da época do ano.

Segundo o RIISPOA, o pH da carne externa do pescado deve ser inferior a 6,8 e o pH da carne interna inferior a 6,5 (BRASIL, 1952).

Baron e Villanueva¹ (1972) apud Bertullo (1975) estimam que o pH do exsudato de camarões considerados bons por uma equipe de degustadores se encontrava entre 6,70 e 7,30; considerando aceitável entre 7,31 e 8,00 e os que estavam acima de 8,00 foram considerados inaceitáveis.

¹ BARON, A.; VILLANUEVA, J. *Estudio de un método sencillo para la determinación de la frescura del camarón refrigerado, por médio del pH del exsudato*. Proy. Des. Pesq. Marit. En Colombia. PNUD-FAO-INDE-REM. Bol. Inf. vol. 2, n. 1, p.17-23, 1972.

De acordo com o RIISPOA, o máximo aceitável de Bases Voláteis Totais (BVT) para o pescado ser considerado fresco é de 0,030g de nitrogênio por 100g de carne (BRASIL, 1952).

2.3.2.1 Temperatura

As mudanças microbiológicas e bioquímicas de camarões durante a estocagem em gelo e na comercialização são relatadas por muitos pesquisadores. A temperatura é uma variável crítica para a qualidade de vários produtos, incluindo o pescado, levando-se em conta que a estocagem do camarão em gelo normalmente não é feita de forma adequada, particularmente em países em desenvolvimento (SHAMSHAD et al., 1990).

A validade comercial será determinada pelo número e espécies bacterianas presentes, a maneira como foi manipulado desde a captura até a estocagem e a temperatura em todas as etapas da pós-captura, que não é apenas a temperatura final do produto no mercado, mas a cadeia de frio, que inclui temperatura ambiente na captura, a demora na refrigeração e flutuações na temperatura de estocagem (NICKELSON II et al., 2001).

2.3.2.2 Formação das Bases Voláteis Totais

O OTMA é um composto nitrogenado não proteico, solúvel em água, de baixo peso molecular (HUSS, 1995) típico de peixes marinhos e invertebrados e é originado a partir de duas fontes principais: acúmulo pela ingestão de fitoplâncton ou biosintetizado pelos próprios animais (HUSS, 1995; VOOYS, 2002). Pode ser reduzido a trimetilamina (TMA) através da degradação não enzimática (CINTRA et al., 1999), por ação de enzimas bacterianas (desaminases) ou pode sofrer decomposição enzimática, gerando uma quantidade equimolar de dimetilamina DMA e formaldeído (FA) (TIMM; JORGENSEN, 2002). A DMA é produzida por enzimas autolíticas (OTMA dimetilase) durante o armazenamento dos peixes congelados e pode ser usada como índice de deterioração durante o armazenamento de pescado congelado, da mesma forma que a TMA é utilizada na alteração microbiana do pescado (GALLARDO et al., 1990). Embora seja inodoro, o OTMA origina compostos que podem alterar o odor do pescado, como a TMA, que é uma amina

volátil e que apresenta odor forte e desagradável, característico de peixes em estado de deterioração (DYER, 1945). A sua presença em peixes em decomposição está relacionada com a redução bacteriana do OTMA, geralmente associada a gêneros bacterianos típicos de ambiente marinho (como *Alteromonas* spp., *Photobacterium* spp., *Vibrio* spp. e *Shewanella putrefaciens*) e também com bactérias da família Enterobacteriaceae e *Aeromonas* spp. (HUSS, 1995).

Acreditava-se que qualquer produção de DMA e TMA fosse proveniente da degradação do OTMA e que qualquer degradação do OTMA se refletia no aumento dos níveis de DMA e/ou TMA. Porém, pesquisas são realizadas no sentido de provar que a degradação do OTMA ocorrerá mais rapidamente que a formação de DMA e/ou TMA caso haja uma inibição de enzima OTMA dimetilase pela presença de oxigênio (SOTELO et al., 1995).

Contreras-Guzmán (1994) apresentou três teorias para a origem do óxido de trimetilamina: origem exógena – síntese de OTMA por algas marrons, verdes e vermelhas, que ao serem ingeridas por peixes herbívoros e zooplâncton acabam passando por todos os elos da cadeia alimentar, de acordo com a quantidade necessária para cada espécie; origem endógena – de acordo com a salinidade do meio os peixes podem excretar o excesso ou sintetizar o OTMA, mesmo se mantidos em jejum ou alimentados com dietas livres de OTMA e, origem mista: os peixes possuem um mecanismo que garante nível mínimo desta substância no organismo, eliminando o excesso ingerido pela dieta ou sintetizando-o em períodos de carência.

O OTMA constitui uma parte característica e importante da fração nitrogenada não proteica nas espécies marinhas (BYSTEDT; SWENNE; AAS, 1959). Pode ser encontrado em quantidade de 1 a 5% do tecido muscular e, dependendo da espécie do pescado, pode apresentar variações em sua concentração.

Huss (1995) relatou que crustáceos e cefalópodes podem atingir concentrações de OTMA maiores que 7% do peso seco de seus tecidos. Quando o OTMA é reduzido à TMA alterações físicas ocorrem, tais como redução do potencial redox, aumento do pH e da condutância elétrica.

Tradicionalmente a avaliação da qualidade do peixe vem se baseando em testes sensoriais. A avaliação química da deterioração de pescado foi iniciada há aproximadamente um século quando foi comprovado, através de pesquisas, que a determinação dos níveis de BVT era um método padrão para a realização da

inspeção de peixes e este método começou a ser muito utilizado na Alemanha (KÖNIG², 1910 apud TIMM; JORGENSEN, 2002). Desde então, o método de determinação de BVT tem sido amplamente empregado na avaliação da qualidade dos peixes, sendo o método não-sensorial mais usado na avaliação da qualidade do pescado fresco e congelado (HUSS, 1995; PEREIRA, 2004).

Reay e Shewan (1949) e Contreras-Guzmán (1994) observaram que, além da amônia, as bases voláteis totais incluem trimetilamina, dimetilamina e, provavelmente, traços de monometilamina, propilamina, que se formam em etapas mais avançadas da decomposição. Igualmente, Tavares et al. (1988) afirmam que o pescado refrigerado pode ser deteriorado pela ação enzimática e bacteriana, resultando na produção de vários compostos nitrogenados, sendo mais frequentes a trimetilamina, a dimetilamina, a amônia e ácidos voláteis. O teor é dado pela determinação das bases voláteis, que aumenta em função da deterioração do produto.

Dessas bases, a que geralmente tem variação mais significativa é a TMA, portanto ela é a principal responsável pela mudança nos valores de BVT, durante a estocagem do pescado em gelo (TAHA, 1988).

Segundo Ogawa (1999) para peixes em excelente estado de frescor, o teor de BVT atinge 5 a 10mg/100g de carne; peixes com frescor razoável podem atingir até 15 a 25mg/100g de carne. No início da putrefação, este teor pode ir até 30 a 40mg/100g e, quando deteriorado, tal conteúdo deve encontrar-se acima de 50mg/100g.

GUZMÁN (1994) reportou que nos peixes de água doce, as BVT variam pouco e de maneira errática, não atingindo o valor de 30mg/100g, apesar de terem sido rejeitados sensorialmente.

O limite de aceitação das bases voláteis totais em pescado é 30mg de N/100g de carne (BRASIL, 1997b; SIKORSKI, 1994; TAVARES et al., 1988).

2.3.2.3 pH

O ácido lático gerado a partir do glicogênio após a morte do pescado, é a causa principal do decréscimo do pH no músculo durante o período de *rigor mortis*

² KONIG, J. *Untersuchung von Nahrungs – Genussmitteln und Gebrauchsgegenständen*, Springer, Berlin, 1910.

(SIKORSKI, 1994). De acordo com Matsumoto e Yamanaka (1990) foi observado no estágio inicial de decomposição o declínio dos níveis de ácido lático no pescado.

A diminuição do pH no músculo durante o rigor mortis tem um efeito nas propriedades físicas no músculo do pescado. À medida que o pH diminui, a textura do músculo é modificada, ocorrendo sua desnaturação parcial e diminuindo a capacidade de retenção de água (HUSS, 1999).

A acidificação influencia a liberação de fosfatos inorgânicos e amoníacos, tendo como consequência a degradação enzimática do ATP (SIKORSKI, 1994). Entretanto, à medida que o pH chega à neutralidade, as chances de alcançar a alcalinidade demonstram que o músculo está entrando em estado de decomposição (KIETZMANN et al., 1974).

A variação do pH parece estar relacionada às condições de armazenamento e procedimentos aos quais é submetido o camarão imediatamente após sua captura (FLORES; CRAWFORD, 1973).

O estabelecimento de valores de pH que correspondessem ao estado de frescor do camarão foi indicado por alguns autores. Bailey et al. (1956) consideraram que em pH até 7,70 o camarão mantinha as características de um produto “fresco”, acima deste valor até 7,95, era considerado de má qualidade, porém aceitável. Valores superiores a 7,95 tornavam desaconselhável o consumo do camarão.

Os resultados de pH para camarão (*Litopenaeus vannamei*) inteiro variaram de 6,54 no primeiro dia de estocagem a 7,0 no último (22 dias) e, para descabeçado, de 6,75 a 7,24, podendo ser explicado por alterações bioquímicas que devido à ação de enzimas tissulares e de microrganismos, promovem a elevação do pH (OLIVEIRA, 2005). Segundo Luna (1971) e Shamshad et al. (1990), pH acima de 7,2 e de 7,6, respectivamente, caracterizavam produto não-comestível.

Moura et al. (2003) citaram alguns valores de pH para as diferentes espécies de camarão encontrados na bibliografia consultada, relativos ao camarão “fresco”: 6,75 em *Penaeus brasiliensis* (LUNA, 1971); 7,4 em *Penaeus aztecus* (FLICK; LOVELL, 1972); 7,05 em *Penaeus merguensis* (SHAMSHAD et al., 1990); e 7,6 em *Pandalus jordani* (FLORES; CRAWFORD, 1973). A variação do pH parece estar relacionada às condições de armazenamento e procedimentos aos quais é submetido o camarão imediatamente após sua captura (FLORES; CRAWFORD, 1973).

A medida do pH não deve ser utilizada individualmente como índice de frescor, pois pode induzir a falsa avaliação. No entanto, seus valores geralmente acompanham, paralelamente, análises químicas, microbiológicas e sensoriais (NORT, 1988).

2.3.2.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada

A histamina é uma amina biogênica não volátil com propriedades tóxicas que, se for ingerida, pode determinar reações alérgicas em indivíduos sensíveis. Esta amina pode ser produzida no pescado a partir do aminoácido histidina através da ação de enzimas descarboxilases de origem bacteriana (SOARES et al., 1998), embora também possa ser originada a partir da aminação de aldeídos, decomposição de fosfolipídios (SILVA et al., 1998). A cadaverina é oriunda do aminoácido lisina por descarboxilação (DE LAS RIVAS et al., 2006). Muitas bactérias coliformes podem formar putrescina e cadaverina por descarboxilação de ornitina e lisina respectivamente (STRATTON et al., 1991; PETRIDIS; STEINHART, 1996; SHARAF et al., 1997).

A contaminação do pescado geralmente ocorre após a captura, durante a manipulação sob condições inadequadas de higiene e conservação sob temperaturas elevadas. Conseqüentemente ocorre ação de enzimas bacterianas descarboxilases que determinam a formação de histamina. As espécies bacterianas mais incriminadas deste processo fazem parte da família *Enterobacteriaceae*. Nesta família destacam-se os seguintes gêneros: *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (ARNOLD; BROWN, 1978; HALÁSZ et al., 1994; SILVA et al., 1998). As espécies representantes desta família que apresentam maior importância quanto à formação de histamina são: *Morganella morganii*; *Hafnia alvei*; *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*.

O RIISPOA (BRASIL, 1980) não faz referência ao limite máximo de histamina permitida no pescado nacional. Porém, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (inteiro e eviscerado) (BRASIL, 1997b) estabelece o limite máximo de 100 ppm (10mg/100g) de histamina na musculatura das espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Coriphaenidae*

e *Pomatomidae*. Em outros países, limites ou níveis máximos aceitáveis desta substância em pescado também foram estabelecidos. Nos Estados Unidos, foi estabelecido pela FDA (1996), para espécies susceptíveis à formação de histamina, o limite máximo de 5 mg de histamina/100g de produto (50 ppm) no porto e 10 mg/100g de produto (100 ppm) nos peixes em conserva. Na Legislação Brasileira não há padrões estabelecidos para a cadaverina e putrescina.

Desta forma, dentre os índices químicos para avaliar a qualidade do pescado, também se inclui a produção de histamina (LÓPEZ-SABATER et al., 1994; SOARES et al., 1998). Segundo Naguib et al. (1995), outras aminas biogênicas como a cadaverina e a tiramina, são consideradas potencializadoras dos efeitos da histamina. E a putrescina, melhor indicador de decomposição de camarões (BENNER et al., 2003).

Contreras-Guzmán (1994) comentou que algumas espécies de pescado que apresentam baixas concentrações de histidina livre (como bagres, trutas de água doce, camarões marinhos, peixes fermentados ou defumados) foram associadas à intoxicações por histamina. Nestes casos, provavelmente a falta de higiene e de refrigeração correta podem ter sido a causa do problema.

De acordo com a sensibilidade de cada indivíduo a concentração de histamina capaz de provocar uma intoxicação irá variar. Em indivíduos sensíveis, valores entre 5 e 10 mg/100g são capazes de provocar efeitos tóxicos (ARNOLD; BROWN, 1978). A sintomatologia da intoxicação histamínica dependerá de vários fatores, sendo considerados os mais importantes: a quantidade de histamina ingerida e a susceptibilidade individual à ação das aminas biogênicas.

A histamina manifesta seus efeitos ligando-se a receptores na membrana celular da pele e dos sistemas respiratório, cardiovascular, gastrointestinal e imunológico (SHALABY, 1996).

Os sinais clínicos são mais severos em pessoas que tomam medicações que inibem as enzimas detoxificantes da histamina no intestino (monoaminoxidase – MAO; diaminoxidase - DAO e N-HMT - N-metiltransferase), em imunossuprimidos e indivíduos que fazem uso de drogas e álcool. Os sintomas da intoxicação histamínica geralmente aparecem pouco depois da ingestão do alimento, com duração de aproximadamente 24 horas (FDA, 2006). O período de incubação típico é maior que uma hora, embora possa haver uma variação grande de indivíduo para indivíduo (ARNOLD; BROWN, 1978).

A única forma segura de se evitar a formação de histamina em pescado é através da correta utilização da cadeia de frio logo após a captura. Assim, deve-se manter o pescado sob temperaturas inferiores a 4°C até que este seja processado (HUSS, 1995; MENDES et al., 2005).

Putrescina e cadaverina causam hipotensão e bradicardia, além de potencializar a toxicidade de outras aminas (SHALABY, 1996). Estas, e também a tiramina, podem potencializar a ação da histamina, pois inibem a DAO e N-HMT aumentando sua absorção intestinal (LEHANE; OLLEY, 2000; TAYLOR, 1990). A combinação de putrescina e cadaverina foi sugerida como índice de aceitabilidade de frescor, porque sua concentração aumenta antes da deterioração e correlaciona bem com a carga microbiana (RUÍZ-CAPILLAS; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2004).

2.3.2.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os lipídios de pescado contêm grande quantidade de ácidos graxos altamente insaturados, que são susceptíveis a oxidação. A reação é realizada por um mecanismo de formação de radicais livres e se caracteriza por um período de indução, seguido por absorção de oxigênio, com formação de peróxidos, hidroperóxidos e compostos secundários, os quais conferem alteração das características sensoriais. A velocidade da reação é catalisada por: luz, calor, irradiação e metais pesados e pode ser retardada pela adição de antioxidantes, que atuam rompendo a cadeia de radicais livres ou decompondo os peróxidos. O perigo alimentar envolvido na ingestão de lipídios de pescado oxidados é atribuído a decomposição de peróxidos com formação de compostos secundários e reações que podem ocorrer no organismo humano. Em geral, o efeito nocivo dos óleos de pescado oxidados reflete danos secundários devidos à formação de radicais livres a partir de decomposição dos peróxidos, tendo estes a capacidade de destruir as vitaminas A e E (OGAWA; MAIA, 1999).

Ainda com relação à oxidação lipídica, Huss (1997) considerou que um dos processos de deterioração química mais importantes se constitui de alterações que ocorrem na fração lipídica do pescado. Os processos de oxidação, que são autocatalíticos, envolvem o oxigênio e os lipídios insaturados. O primeiro passo leva à formação de peróxidos, que não conferem nenhum sabor, mas podem levar ao

aparecimento de colorações castanhas ou amarela no tecido. O peróxido produz hidroperóxido e a degradação de hidroperóxidos origina a formação de compostos voláteis, com aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos carboxílicos, que determinam um extenso espectro de odores e sabores, por exemplo, um forte sabor de ranço.

A qualidade do alimento não é afetada até que os compostos voláteis sejam formados. O aldeído mais comumente citado como produto da oxidação lipídica é o malonaldeído, um dialdeído com três átomos de carbono, que reagem com o 2-ácido tiobarbitúrico produzindo coloração vermelha medida espectrofotometricamente (ARAÚJO, 2001).

Osawa et al. (2005) ainda explicaram que a rancidez ou oxidação de lipídios, além de gerar produtos indesejáveis sob o ponto de vista sensorial, destrói vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais. O teste de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) quantifica, dentre outras substâncias, o malonaldeído, um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo. Para o pescado e produtos à base de peixe, o teste é um dos mais adequados na avaliação da rancidez, apesar da reação não ser específica e estar sujeita à ação de interferentes.

O conteúdo de TBARS é um importante índice de qualidade, indicando a oxidação lipídica. O produto pode ser considerado em bom estado, apresentando valores abaixo de 3,0 mg de malonaldeído/Kg de amostra, sendo os limites de oxidação lipídica para o consumo de 7-8 mg de malonaldeído/Kg no alimento (CADUN; CAKLI; KISLA, 2005).

Uma das formas de quantificar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é através da destilação, onde o alimento é destilado, seguido de aquecimento para o desenvolvimento máximo de cor e medição espectrofotométrica. Porém, a destilação, apesar de muito usada, resulta em valores mais altos, pois o aquecimento da amostra durante seu procedimento pode induzir à oxidação, aumentando a quantidade de aldeídos ou ainda acelerando a reação, resultando em valores mais elevados de TBARS (OSAWA et al., 2005).

De acordo com Botsoglou et al. (1994), a aplicabilidade do método em vários tecidos animais, alimentos e amostras de alimento também tem sido testada devido à sua simplicidade e maior sensibilidade e especificidade; o método pode ser preferível a outros métodos para estimar a extensão da peroxidação lipídica.

A maioria dos estudos sobre oxidação de pescado é voltada para espécies de

peixes gordurosos, os quais são mais susceptíveis à rancificação (HUANG et al., 1998).

Ke et al. (1984) estudaram valores de TBARS para várias espécies de pescado e concluíram que valores inferiores a 0,57 mg de malonaldeído/Kg indicam baixas taxas de rancidez, entre 0,65 a 1,44 como levemente rançosos e valores superiores a 1,51 como rançosos e inaceitáveis.

Al-Kahtani et al. (1996) indicaram valores abaixo de 3,0 mg de malonaldeído/Kg para pescado como limite aceitável para consumo. Na Legislação Brasileira não há padrões estabelecidos para a análise de TBARS.

Moura et al. (2003) encontraram, em camarão-rosa, uma média de $1,31 \pm 0,69$ mg de malonaldeído/Kg. Já, Abreu (2006), em seu trabalho com caudas de camarão não irradiadas, obteve média de 0,32 mg de malonaldeído/Kg.

2.3.2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Esta é a técnica oficial para a detecção de histamina em pescado para a comissão da União Européia (UNIÃO EUROPEIA, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência, oferece vantagem sobre as outras técnicas por ser mais eficiente na separação e quantificação simultânea de aminas bioativas (BAUZA et al., 1995). Há descrição de diversos métodos utilizados para análise de aminas biogênicas em materiais biológicos, porém para uma determinação rápida e precisa, em compostos nos alimentos, rações completas e tecidos animais, deve-se aplicar o método de cromatografia líquida de alta eficiência (SHALABY, 1996).

Para a quantificação deve-se realizar a extração de aminas da matriz e fazer a sua determinação em aparelho específico. Vários solventes têm sido testados devido à capacidade de extração, incluindo o ácido tricloroacético, ácido perclórico, ácido hidrolórico e metanol (MIETZ; KARMAS³, 1977 apud TAMIM et al., 2002).

Zhao et al. (2007), estudaram a determinação de aminas biogênicas em lula e camarão branco e utilizando o método de CLAE, com derivatização pós coluna e pesquisaram sete aminas (tiramina, putrescina, cadaverina, histamina, espermidina, agmatina e espermina). Separaram as amostras de acordo com o grau de

³ MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Chemical index of canned tuna determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, v. 42, p. 155-158, 1977.

decomposição, utilizando-se de testes sensoriais e classificando o material em aceitável, decomposição inicial e decomposição avançada e as estocaram a zero e 4°C. Chegaram a conclusão de que, embora tenham pesquisado as aminas supracitadas, em se tratando de camarões, acharam mais adequado avaliar o grau de cadaverina e putrescina.

Saaid et al. (2009), pesquisaram as aminas biogênicas putrescina (PUT) e histamina (HIS), utilizando o método de CLAE em 62 itens selecionados de alimentos comumente consumidos na Malásia e, para a amostra de camarão seco, demonstraram através de tabela comparativa com os demais alimentos, o valor de 2,1 mg.Kg⁻¹.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será relacionado todo o material empregado para o desenvolvimento da parte experimental deste estudo, assim como a metodologia utilizada.

3.1 MATERIAL

A seguir serão relacionados os materiais utilizados em todas as etapas do presente experimento.

3.1.1 Equipamentos e material de uso geral

Agitador de tubos tipo Vórtex – Braun Biotech International[®]; Autoclave – Fabee[®]; Balança analítica modelo AM 550 utilizada para a pesagem precisa de alguns reagentes, sub-amostras; Balança de precisão – Mettler AE 200 para pesagem das amostras e meios de cultura; Balão de fundo chato de 1 e 2 L; Banho-maria marca Incomap[®]; Bandeja de inox; Bastão de vidro; Béquer de 600 mL e 1 L; Bisturi; Bomba de vácuo; Cápsulas de porcelana; Centrífuga – Hermle[®] Z 360 K; Contador de Colônias marca Quebec Darkfield[®]; Cromatógrafo Shimadzu[®]; Cuba cromatográfica; Destilador – Quimis[®]; Envelopes plásticos de homogeneização para “Stomacher”; Erlenmeyer de Kitasato; Espectrofotômetro UV – “Visible Recording Spectrophotometer” (UV – 160 A) Shimadzu[®]; Espátula; Estufa marca Fanem[®] regulada a 35-37 °C; Estufa marca Fanem[®] regulada a 105 °C; Fogão Brastemp[®]

para preparo dos meios de cultura; Freezer Brastemp[®]; Funil de Büchner; Grau; Homogeneizador (Waring Blender[®]); Homogeneizador “Stomacher” – Seward (modelo 80); Liquidificador Osterizer[®], Máquina fotográfica – Olympus[®] FE 120; Microbureta de 5 µL; Microseringa de 10 µL – Terumo[®] UMS 10; Pinça; Pipeta automática DIGIPET[®] de 100-1000 µL; Pipetas graduadas (1; 2; 5; 10; 20 e 25 mL); Pistilo; Placa de microdifusão de Conway com tampa de vidro esmerilhada; Placas de Petri esterilizadas e descartáveis; Placa de Sílica gel em Poliéster – Sigma-Aldrich[®]; Provetas (50 100 e 250 mL); Refrigerador Brastemp[®], modelo Double D440; Potenciômetro Schott Geräte[®]; Tela de amianto; Tesoura e Tubos de rosca com tampa em baquelite.

3.1.2 Material de Consumo

Acetona P.A. – Proquimios[®]; Ácido Acético Glacial Merk[®]; Ácido 2-tiobarbitúrico P.A. Merk[®]; Ácido Tricloroacético P.A. Merk[®]; Ácido Bórico P.A. Vetec[®]; Ácido Clorídrico 0,01N; Ácido Fosfórico; Ágar Baird Parker; Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile Glicose; Ágar Estoque; Ágar Nutriente; Ágar Verde Brilhante; Ágar Hektoen; Ágar Salmonella Diferencial; Água Oxigenada 10v; Azul de Metileno; Álcool a 70%; Álcool Etílico P.A./A.C.S. Reagen[®]; Algodão hidrófilo; Cloreto de Bário; Carbonato de Cálcio; Carbonato de Potássio P.A. Merck[®]; Cloreto de Sódio; Coágulo Plasma de Coelho; Caldo “Brain Heart Infusion” (BHI); Embalagens plásticas descartáveis; Fenolftaleína; Fitas de oxidase; Gema de ovo; Hidróxido de Amônio; Hidróxido de Sódio Merck[®]; Indicador misto de Tashiro; Lâmina de vidro; Ninhydrina; Papel Alumínio e Papel Filtro NS 185 mm - Walthman, nº 5; Solução Salina Peptonada; Solução Tampão pH 4,0; Solução Tampão pH 7,0; Soro Polivalente para *Salmonella* Probac do Brasil[®]; Telurito de Potássio e Vaselina Sólida.

3.1.3 Material Biológico

Para esta pesquisa foram utilizadas 60 amostras de camarão cru (Figura 1), descascado e resfriado de diversas espécies provenientes dos balcões expositores dos boxes de um Mercado de peixe do Município de Niterói (RJ) durante um período de três meses (de julho a setembro) durante o ano de 2010.



Figura 1: Camarões crus descascados resfriados utilizados neste estudo (ARQUIVO PESSOAL, 2010).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estratégia Experimental

Os fatores de risco foram Contagem de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva, Pesquisa de Bactérias do gênero *Salmonella* spp., Contagem Total de Enterobacteriáceas, Temperatura, Bases Voláteis Totais (BVT), pH, Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina e Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Todo o delineamento experimental foi baseado em Thrusfield (2003) e procedeu-se da seguinte forma: adotou-se uma prevalência de 5% (taxa de ocorrência estimada) onde 60 amostras tiveram seus fatores de risco estudados por 12 boxes, cinco amostras em cada um dos locais de aquisição das amostras e foram submetidas à estatística descritiva através de média, desvio padrão, valores máximos e mínimos, adotando-se $p < 0,05$ e os “softwares” utilizados foram o INSTAT[®] 3.0 (MOTULSKY, 1998) e o BioEstat[®] 5.0 (AYRES et al., 2007). A equação utilizada para o cálculo no número de amostras foi $n = \log(1-IC)/\log(1-p)$ onde IC é o

Intervalo de Confiança e o p é a Prevalência Estimada ou Proporção Estimada do Evento.

A primeira Análise foi a de Variância (ANOVA), para avaliar a diferença significativa dos fatores de risco entre todos boxes. Os fatores de risco foram analisados por boxes pela análise de variância e o erro alfa foi de 5% de significância.

Em seguida, foi calculada a frequência de Isolamento de *Salmonella* spp. por box utilizando-se o Teste de Qui-Quadrado.

A presença ou ausência de *Salmonella* spp. foi analisada frente os parâmetros físico-químicos por Regressão Logística Simples e Risco de Recuperação de *Salmonella* spp. por Odds Ratio, onde o Intervalo de Confiança para todas as análises foi de 95%.

Depois foi realizada a Análise de Regressão Múltipla para verificar a relação entre Contagem de Enterobacteriáceas frente a Temperatura, Bases Voláteis Totais (BVT), pH, Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Separadamente, também foi realizada a Análise de Regressão Múltipla para *Staphylococcus* Coagulase Positiva frente aos mesmos fatores físico-químicos citados anteriormente.

E em outra instância, Aminas Biogênicas foram analisadas por Análise de Regressão Múltipla.

Todas as análises utilizaram um erro alfa de 5% de significância e foram apresentadas em forma de tabelas.

3.2.2 Obtenção das amostras, preparo e processamento das subamostras

Após sorteio dos boxes, foram adquiridas semanalmente, cinco amostras de 500g cada - com temperatura aferida no local - de cada um dos 12 boxes, totalizando 60 amostras, durante um período de três meses (de julho a setembro).

Todas as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas de polietileno e arrumadas em caixas isotérmicas (poliestireno expandido) com gelo artificial e transportadas imediatamente até o Laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ para aferição do pH e início das análises bacteriológicas. Após a retirada de uma pequena alíquota a ser utilizada nas análises bacteriológicas, o referido material foi

novamente pesado, embalado em pequenas porções e identificado com nome da análise, peso e método, de acordo com a necessidade de cada análise físico-química e seguiu para o congelamento a -18°C para posteriores análises físico-químicas.

3.2.3 Análises Bacteriológicas

3.2.3.1 Preparo das soluções e meios de cultura

As soluções e os meios de cultura utilizados durante as análises foram preparados segundo metodologia descrita por BRASIL (2003).

3.2.3.2 Cuidados higiênico-sanitários

Antes de executar as análises propriamente ditas foram adotados alguns cuidados higiênico-sanitários evitando a contaminação da amostra e conseqüentemente mantendo as características próprias do produto. Foi realizada a lavagem correta das mãos (com sabonete líquido inodoro, seguido por enxague abundante), sanificação da bancada utilizada na câmara asséptica com álcool a 70%, flambagem de todos os utensílios usados (como bisturi, tesoura, pinça e bandeja de inox).

3.2.3.3 Contagem de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva

Seguindo a metodologia de Brasil (2003), para a realização dessa análise, foram pesados 25 gramas de cada amostra, em sacos plásticos estéreis e adicionado 225 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1%. As amostras foram homogeneizadas em “stomacher” na velocidade normal por dois minutos e realizadas duas diluições decimais seriadas até 10^{-3} . Na primeira foi colocado 1 mL da amostra líquida em 9 mL de solução salina peptonada a 0,1% (diluição 10^{-2}). Para obter a segunda diluição, foi transferido 1 mL da primeira para outro tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada a 0,1% (diluição 10^{-3}).

Com o auxílio de uma pipeta automática, foi semeada uma alíquota de 0,1 mL das diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em placas contendo Ágar Baird-Parker,

devidamente identificadas com data, nome e a respectiva diluição recebida. Com o auxílio de alça de Drygalski, previamente mergulhada em álcool etílico a 70% , e flambada rapidamente na chama do bico de Bunsen, o inóculo foi espalhado cuidadosamente por toda a superfície do meio de cultura com movimentos nos quatro sentidos até secar toda a superfície do meio. Após este procedimento, as placas foram incubadas em posição invertida em estufa com temperatura entre 35 e 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi observada a presença de colônias típicas e atípicas suspeitas de *Staphylococcus* Coagulase Positivo. As colônias típicas eram circulares, pretas, lisas, convexas com bordas perfeitas, massa de célula esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca (devido à redução de telurito de potássio, presente no meio, a telureto, convexas, com 1 a 5 mm de diâmetro, rodeadas por um halo claro de 2 a 5 mm (devido a ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas que agiram na emulsão de gema de ovo que é utilizada como suplemento do meio). As colônias atípicas suspeitas eram acinzentas ou pretas brilhantes, sem halo. Das três placas com crescimento, a escolhida para a contagem foi a placa com número entre 15 a 150 UFC por placa. Eliminou-se placas onde houve o crescimento de poucas colônias e/ou placas com crescimento excessivo. Em seguida, antes da realização das provas bioquímicas, para a confirmar se as colônias típicas, eram realmente de cocos G (+), transferiu-se três colônias típicas, com o auxílio de uma agulha, previamente flambada, para um tubo identificado contendo o Caldo “Brain Heart Infusion” (BHI), devidamente identificado, o qual foi incubado em estufa com temperatura entre 35 - 37 °C por 24 horas. Em seguida, fez-se um esfregaço corado pela Coloração do Método de Gram para observação microscópica por imagem de cocos Gram positivos. Os tubos cujas bactérias apresentavam essas características foram encaminhados para as provas bioquímicas da catalase e da coagulase, sendo o microrganismo, positivo para as duas provas.

- Prova da Coagulase: Transferiu-se com auxílio de pipeta automática, 200 µL do subcultivo em meio BHI para tubos de ensaio previamente esterilizados e identificados, contendo 200 µL de plasma de coelho com EDTA (hidratado). Os tubos foram incubados em estufa 35 – 37 °C por 24 horas. No dia seguinte, observou-se a coagulação do plasma, devido a transformação do fibrinogênio em fibrina, sendo assim, caracterizando a prova como como positiva. Os resultados

variam de uma a quatro cruces de acordo com as características do coágulo: um cruz – apenas um botão no fundo do tubo; duas cruces, coágulo com presença bem visível de fibrina; três cruces, o coágulo adota a posição diagonal quando inclinado e quatro cruces, o coágulo não se move mesmo com a inversão do tubo de ensaio.

- Prova da Catalase: Com auxílio de uma alça de platina foi transferida do BHI para um tubo identificado contendo Ágar Nutriente Inclinado, fazendo estriamento em sua superfície. Este meio foi incubado por 24 horas em estufa a 35 – 37 °C. Após a incubação foram adicionadas três gotas de peróxido de hidrogênio (3%-10v) neste meio. Com isso, houve uma reação de efervescência, o que indica a prova positiva para catalase, pois a enzima catalase atua sobre o peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio.

Os resultados de contagem das colônias foram colocados na seguinte fórmula: $R=C \times c \times d / r$ (onde R: resultado; C: número de colônias contadas; c: número de colônias repicadas; d: diluição da placa escolhida e r: número de colônias repicadas) (APHA, 2001). O resultado foi obtido em UFC/g.

3.2.3.4 Pesquisa de Bactérias do gênero *Salmonella* spp.

A metodologia utilizada para o isolamento de *Salmonella* spp. foi o método rápido proposto por Pignato et al. (1995).

Para o pré-enriquecimento, foi empregado a mesma metodologia para obtenção da diluição 10^{-1} , através da homogeneização de 25g de amostra em 225 mL de caldo Salmosyst base e esta foi incubada em estufa à 35°C/6h. Na etapa, denominada enriquecimento não seletivo, parte-se desta suspensão e pipeta-se 10 mL para inoculação em tubo contendo 1mL do Caldo Salmosyst Suplemento que seguiu para incubação a 35°C/18h, para procedimento do enriquecimento seletivo.

A partir do enriquecimento seletivo foram semeadas alíquotas dos cultivos correspondentes em caldo Salmosyst através da técnica de esgotamento em três placas de petri contendo os meios Ágar Salmonella Diferencial (colônias vermelhas); Ágar Verde Brilhante (colônias incolores com meio rosa) e Ágar Hektoen (colônias verde azuladas ou azul esverdeadas com ou sem centro preto indicativo de produção de H₂S) para isolamento de *Salmonella* spp. e realização da etapa de plaqueamento seletivo. As placas seguiram para a incubação a 35-37 °C por 24 horas. Para a etapa de triagem, de cada placa foram retiradas três colônias típicas e

semeadas em três tubos de ensaio com Ágar “Triple Sugar Iron” (TSI), que é um meio indicativo não seletivo, com auxílio de uma agulha, perfurando o meio, em torno de dois terços, e realizando estriamento na superfície. Os tubos seguiram para a incubação a 35-37 °C por 18-24 horas e, em seguida, separados de acordo com o resultado da coloração do meio em bixel pequeno e base alta. Observam-se os tubos positivos com bixel vermelho cereja (indicando que a bactéria utilizou peptona como fonte de nitrogênio, alcalinizando o meio), a parte central preta (bactéria reduziu o tiosulfato de sódio que em contato com o sulfato ferroso amoniacal gerou o gás sulfídrico, dando a coloração preta) e base amarela em função da fermentação da glicose. O indicador de pH presente neste meio é vermelho de fenol, que apresenta o comportamento acima referido de acordo com o pH do meio. Cada cultivo suspeito de *Salmonella* spp. foi semeado em Caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) para início da prova de sorologia que procedeu adicionando-se 50 µL da amostra de um dos tubos mais 50 µL de Soro *Salmonella* Polivalente Probac do Brasil[®] sobre placa de vidro quadriculada e observação (contra a luz) da presença de grumos indicativos de positividade da prova.

O resultado é qualitativo, baseando-se na presença ou ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra.

3.2.3.5 Contagem Total de Enterobacteriáceas

Seguindo a metodologia de Brasil (2003), para a realização de análise, foram pesados 25 gramas de cada amostra, em sacos plásticos estéreis e adicionado 225 mL de Solução Salina Peptonada (SSP) a 0,1%. As amostras foram homogeneizadas em “stomacher” na velocidade normal por dois minutos e realizadas duas diluições decimais seriadas até 10^{-3} . Na primeira foi colocado 1 mL da amostra líquida em 9 mL de solução salina peptonada a 0,1% (diluição 10^{-2}). Para obter a segunda diluição, foi transferido 1 mL da primeira para outro tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada a 0,1% (diluição 10^{-3}).

Com o auxílio de uma pipeta automática, foi adicionada uma alíquota de 1,0 mL das diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em placas com as mesmas identificações dessas diluições. Foi realizada a técnica de “Pour Plate” (semeadura em profundidade) em dupla camada utilizando-se o meio Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile Glicose (VRBG), que estava mantido em banho-maria, com temperatura

entre 45-50 °C. Em seguida, foram vertidos de 18 mL deste meio Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile Glicose (VRBG) em cada uma das duas placas de Petri, homogeneizando suavemente as mesmas com 10 giros para direita e 10 giros para esquerda. Após a solidificação do meio, pegou-se mais dois tubos, uma de cada vez e com o mesmo volume de antes, contendo VRBG, que estava mantido em banho-maria, com intervalo de temperatura entre 45-50 °C e enxugou-se os mesmos com papel toalha. Em seguida, foram despejados 18 mL do meio VRBG em cada uma das duas placas de Petri. Depois da solidificação, as placas foram incubadas invertidas, em estufa com temperatura em torno de 35-37 °C, por 24 horas. Após este período de incubação, foram escolhidas placas com 15-150 UFC típicas (vermelhas com precipitado em volta). Três colônias típicas foram repicadas em três tubos identificados contendo Ágar Estoque com o auxílio de uma agulha de platina flambada estriando-se colônia sobre a superfície deste. Após incubação em estufa com temperatura entre 35-37 °C por 24 horas, foi realizado esfregaço de cada tubo para observação de bastonetes Gram negativos por bacterioscopia de imersão. Os tubos cujos esfregaços foram encontrados bastonetes Gram negativos, seguiram para a Prova da Oxidase, que com auxílio de uma Alça de Platina, retira-se uma parte das colônias da superfície do Ágar Estoque e fricciona-se sobre a Fita para Reação de Oxidase (N-N-N-N tetrametilparafenileno de amina). O resultado objetivado é o negativo, que é uma característica da família *Enterobacteriaceae*. A reação positiva seria o desenvolvimento de uma cor vermelha intensa ou azulada.

O resultado foi obtido com a multiplicação do número de colônias na placa escolhida durante a contagem pelo Fator de Diluição dessa mesma placa (em UFC/g).

3.2.4 Análises Físico-Químicas

3.2.4.1 Aferição da Temperatura

A temperatura foi avaliada três vezes: no início, no meio e no final da pilha de camarões descascados dentro dos monoblocos expostos sobre os balcões expositores e depois foi calculada a média aritmética das 3 medidas. Usou-se um

termômetro digital com haste metálica de penetração para medir a temperatura interna de pescado refrigerado.

3.2.4.2 Avaliação da Produção de Bases Voláteis Totais (BVT)

A determinação de BVT foi realizada através do método de microdifusão em placas de Conway. Este método tem como princípio a liberação do nitrogênio volátil presente na amostra através da adição de solução de carbonato de potássio. O nitrogênio volátil liberado irá se difundir em um solução de ácido bórico que, posteriormente, será titulado com solução padronizada de ácido clorídrico (CONWAY; BIRNE, 1993).

Foi procedida análise em duplicata (com obtenção de média no final), da seguinte forma: para o preparo do extrato, triturou-se em liquidificador 10g da amostra com 10mL de ácido tricloroacético a 10%. Filtrou-se em funil de Büchner, usando papel de filtro Whatman nº 5 com auxílio de uma bomba de vácuo.

Após a preparação do extrato, colocou-se 2 mL de solução de ácido bórico de Conway no compartimento central da placa de microdifusão. Adicionou-se, no compartimento externo, 2mL de extrato fresco. Colocou-se a tampa com vaselina para que a placa fosse parcialmente vedada pelo lado rugoso, deixando uma pequena abertura no compartimento externo para adicionar 2 mL de solução saturada e filtrada de carbonato de potássio. Deslizou-se a tampa para fechar hermeticamente a placa. Girou-se suavemente para homogeneizar o conteúdo externo. Deixou-se em estufa regulada a 35-36°C por duas horas. Após esse período, retirou-se a tampa e titulou-se as bases voláteis, que se difundiram no ácido bórico, com uma solução de ácido clorídrico 0,01 N.

Para determinação do BVT, utilizou-se o seguinte cálculo:

$\text{mg de N-BVT}/100\text{g} = \text{VxNx14x100x(T+U)}/\text{VaxP}$; onde: V= volume de ácido (mL) gasto na titulação de BVT; N= normalidade da solução do ácido usado; T= volume da solução de ácido tricloroacético usado; U= umidade da amostra; Va= volume da alíquota analisada (2 mL) e P= peso da amostra utilizada no preparo do extrato.

3.2.4.3 Determinação do pH

O manual utilizado pelo LANARA (BRASIL, 1981) prevê como técnica padrão para determinação do pH, o emprego do método potenciométrico, no qual a extremidade do eletrodo é imersa em 10 mL da solução de água destilada recentemente na temperatura ambiente, com 50g da amostra macerada e homogeneizada. Prevê ainda, os valores do pH de 5,8 a 6,2, para carnes próprias para consumo imediato e acima deste índice um início de decomposição.

3.2.4.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada

A determinação dos níveis de histamina nas amostras analisadas foi realizada segundo a metodologia descrita por Schutz, Chang e Bjeldanes (1976), utilizando as modificações sugeridas por Bersot, São Clemente e Santos (1996).

Foram adicionados 2 mL de metanol a um tubo de ensaio contendo 1g de amostra. O tubo foi homogeneizado em agitador tipo Vórtex com auxílio de uma espátula e depois foi aquecido em banho-maria a 100°C, para facilitar a coagulação das proteínas e liberação das aminas biogênicas no metanol. A seguir, o tubo foi encaminhado para a centrífuga, onde permaneceu por dois minutos, a 503g. O sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação de histamina, cadaverina e putrescina.

Paralelamente foi preparado a cuba de cromatografia com a adição de uma mistura de solventes constituído por acetona e hidróxido de amônio na proporção de 20:1 v/v. Após a adição dos solventes, a cuba foi fechada para equilíbrio da atmosfera interna.

Para avaliação da presença de histamina, foram utilizadas placas de 10x10cm e nelas foram aplicados os padrões e as amostras em locais previamente determinados. Os padrões de cadaverina, histamina e putrescina foram aplicados à placa com o auxílio de uma microseringa (Hamilton[®]) nos volumes de 2µL, 5 µL e 10 µL. As quantidades aplicadas correspondiam, respectivamente, a 2, 5 e 10 mg de histamina/100g de amostra. Em relação a amostra, foi aplicada à placa 10 µL do sobrenadante obtido na centrifugação da amostra através de uma pipeta automática.

Logo após seu preparo, a placa foi inserida verticalmente no interior do tanque de cromatografia que foi imediatamente fechado para que houvesse a corrida cromatográfica. Ao término desta, a placa foi retirada do tanque com a pinça e seca com fluxo de ar quente e contínuo para a retirada do excesso de hidróxido de amônio e, a seguir, colocada em estufa regulada a 35°C por cerca de uma hora. Após este período, a placa foi retirada da estufa e recebeu aspersione uniforme com solução de ninhidrina a 3% seguida por novo fluxo de ar quente e contínuo. Este procedimento faz-se necessário para que o processo de revelação e de obtenção das manchas correspondentes aos padrões de histamina e da amostra fosse apropriado.

O resultado foi obtido comparando-se as marcas dos padrões de histamina com as marcas de mesmo deslocamento das amostras tanto para altura quanto para diâmetro das mesmas. A identificação da presença de cadaverina e putrescina também se deu pela identificação da altura e do diâmetro das manchas.

3.2.4.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Esta técnica foi baseada em Vyncke (1970) e fundamenta-se na formação de um composto de coloração vermelha resultante da condensação de 2 moles de ácido 2-tiobarbitúrico com 1 mol de aldeído malônico ou de seus tautômeros originados na oxidação dos lipídeos.

Os materiais e equipamentos usados são: balança; proveta de 50 mL e 10 mL; pipetas de 2 e 5 mL; destilador (com tubos) de Kjeldahl; tubos de ensaio com tampa rosqueada; estante para tubo de ensaio; placa aquecedora; béquer de 50 mL; potenciômetro e espectrofotômetro.

Preparo dos Reagentes:

- Solução de ácido tiobarbitúrico (dissolução de 0,02 M do ácido 2-tiobarbitúrico e ácido acético glacial a 90%).

Quadro 1: Quantidade proporcional do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), da água destilada e do ácido acético para a reação com o malonaldeído presente nas amostras analisadas.

TBA (g)	H ₂ O destilada (mL)	Ácido acético glacial p.a. (mL)
0,5766	20	180
0,2883	10	90
0,1442	5	45

Coloca-se o TBA em um béquer e adiciona-se água destilada e 2/3 do ácido acético. Promover a dissolução em agitador à temperatura ambiente. Quando estiver completamente dissolvido, acertar o volume com o restante do ácido acético em balão volumétrico, conforme o Quadro 1. Armazenar em geladeira por até 7 dias.

- Ácido clorídrico 4 N: 1 parte de HCl concentrado para duas partes de água destilada (1:2).

Foi pesado em béquer, 5g de amostra previamente homogeneizada e acrescentou-se 12,5 mL de água destilada. A mistura foi transferida para um tubo de destilação do tipo Kjeldahl com auxílio de 11,875 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 0,630 mL de ácido clorídrico (HCl) 4N para corrigir o pH para 1,5.

Porteriormente, iniciou-se a destilação** e recolheu-se 20 mL do destilado em aproximadamente 4 minutos após o início da ebulição. Retirou-se 5 mL do destilado e colocou-se em tubo de ensaio rosqueado onde se adicionou 5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA). Fez-se o branco* em tubo de ensaio separado onde foram adicionados 5 mL de água destilada e 5 mL de TBA. Os tubos foram fechados, agitados e imersos em banho de água fervente por 35 minutos, sendo então retirados e resfriados em água corrente por 10 minutos. Em seguida, fez-se a leitura da absorbância da amostra em espectrofotômetro a 538 nm previamente calibrado com o branco. Para encontrar o n^o de TBA, multiplicou-se o valor encontrado na leitura da absorbância por 3,9, convertendo o resultado para mg de malonaldeído por Kg ou 1000g do produto analisado.

Cálculo: N^o de TBA = mg de aldeído malônico/Kg ou 1000g

*Branco = Todos os reagentes menos a amostra = 5 mL de água destilada + 5 mL de TBA aquece em banho-maria por 35 minutos juntamente com as amostras

****Destilação:**

Ligar o destilador, ligar a mangueira de entrada de água, posicionar a mangueira de saída de água e de valor para o interior da pia, sempre mantendo-as

livres. Ligar o botão de aquecimento a 99°C e aguardar borbulhar a água da caldeira. Diminuir 1/3 da temperatura para aproximadamente 30°C. Ajustar a temperatura com o auxílio dos botões do painel. Sempre que o nível de água da caldeira estiver baixo, pausar o processo e reabastecer o aparelho com água pressionando ininterruptamente o botão da caldeira, para entrada automática da água até a faixa de segurança. Após soltar o botão da caldeira, ajustar o tubo com a amostra, ligar o aquecimento e posicionar o erlenmeyer na saída o extrator e obter 20 mL. Passar para o tubo de rosca em baquelite 5 mL, tampar e levar à geladeira para posterior adição de TBA em todos.

3.2.4.6 Identificação e Quantificação de Histamina pelo Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras foram analisadas segundo método modificado do proposto por Conte-Junior et al. (2006). As amostras foram preparadas em duas etapas: na primeira etapa - extração - utilizou-se 5g de amostra macerada, homogeneizada e pesada já em tubos cônicos pré identificados. Em cada um adicionou-se 5 mL de solução de 5% de ácido perclórico (1:1 v:p), colocou-se rolha de borracha e, durante uma hora, foram mantidos sob refrigeração ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$) e submetidos a agitação, para homogeneização, durante 30 segundos com intervalos de 10 em 10 minutos. Posteriormente, as rolhas foram retiradas e centrifugou-se em 3.000 rpm, a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 10 minutos (RODRÍGUEZ et al., 2001). Retirou-se os tubos da centrífuga e fez-se a primeira filtragem Papel Whatman[®] n^o 1 com cada funil e cada tubo de rosca em baquelite identificados. Quando a filtragem finalizou, adicionou-se 1 mL de NaOH (2M) e aferiu-se o pH, que ficou igual ou superior a 6,0. Quando necessário, adicionou-se mais NaOH (2M) até atingir $\text{pH} > 6,0$. Seguiu-se para o banho de gelo por 20 minutos onde uma estante com os tubos ficou submersa em água com gelo artificial dentro de caixa isotérmica. Depois, submeteu-se os conteúdos à segunda filtragem em novo Papel Whatman[®] n^o 1.

Na segunda etapa, a derivatização das amostras e iniciou com a adição de 1 mL de NaOH (2M) ou mais até que o pH fosse superior a 13,0. Acrescentou-se a cada tubo 40 µL de Cloreto de Benzoíla em capela, agitou-se em vórtex durante 15 segundos, deixou-se em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente (MEI, 1994). Após o repouso, adicionou-se 1 mL de éter dietílico por duas vezes,

homogeneizando as duas fases para maior interação, aproveitando-se a fase etérea (sobrenadante) com auxílio de pipeta automática. Ejetou-se o éter em novo tubo com rosca em baquelite e repetiu-se toda a operação com mais 1 mL de éter dietílico. Evaporou-se os 2 mL de éter com auxílio de corrente de fluxo contínuo de nitrogênio (N₂). Nesses tubos com éter evaporado, ressuspendeu-se com 500µL de uma mistura de acetonitrila:água 42:58 (v:v).

As condições analíticas utilizadas para a CLAE foram: Cromatógrafo Shimadzu LC/10 AS, equipado com coluna Teknokroma Tracer Extrasil ODS2 (15 x 0,46 cm, id. 5µm), coluna guarda Ascentis C18 (2 x 0,40 cm, id. 5µm) da Supelco, detector UV SPD/10 AV utilizando-se o comprimento de onda de 198 nm, volume de injeção de 20 µL com fluxo de 1mL/min e separação isocrática com fase móvel de acetonitrila:água 42:58 (v:v).

A presença de histamina nas amostras foi observada tomando como base o tempo de retenção verificado para os padrões desta amina. Para realização do cálculo das concentrações foram realizadas injeções de diferentes concentrações de histamina (SIGMA-ALDRICH, USA). Com o cálculo da área do gráfico tem-se os valores da amina biogênica pesquisada.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises bacteriológicas e físico-químicas das amostras de camarão descascado resfriado estão relacionadas nas tabelas a seguir.

4.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

4.1.1 Contagem de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva

Das 60 amostras, somente 56,6% estavam dentro dos padrões exigidos de no máximo 10^3 UFC/g.

Na Tabela 2, observa-se que as médias e os desvios padrão da Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva estão agrupados em 12 grupos representativos dos boxes onde as amostras foram adquiridas.

Não houve diferença significativa entre os valores médios de Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva encontrados entre os boxes estudados na Regressão Logística Simples quando estudados isoladamente ($p > 0,05$).

Esses valores são responsáveis por 6,75% da Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva.

4.1.2 Pesquisa de Bactérias do gênero *Salmonella* spp.

Das 60 amostras, somente 18 (30%) encontravam-se dentro dos padrões exigidos de ausência em 25g.

Como os resultados da Pesquisa de *Salmonella* spp. são qualitativos, dentro da estatística não-paramétrica escolheu-se o Teste do Qui-Quadrado que foi baseado em ausência ou presença desse gênero bacteriano, levando a associação das variáveis entre linhas e colunas não significativa.

Tabela 1: Frequência e Percentual de Incidência de *Salmonella* spp. em 60 amostras de camarão cru, descascado e resfriado comercializado em um Mercado de Peixe do Município de Niterói/RJ, distribuídas em 12 boxes.

BOXES	Frequência (Incidência/nº-amostras)	Percentual de incidência por box
1	4/5	80
2	2/5	40
3	3/5	60
4	4/5	80
5	5/5	100
6	3/5	60
7	3/5	60
8	3/5	60
9	5/5	100
10	2/5	40
11	3/5	60
12	5/5	100
Total	42/60	70%

A *Salmonella* spp. foi encontrada em 42 das 60 amostras analisadas ou em 70% como foi demonstrado na Tabela 1.

4.1.3 Contagem Total de Enterobacteriáceas

Todas as amostras encontraram-se fora dos padrões exigidos pela Legislação Brasileira que é de <10 UFC/g.

Na Tabela 2, após tratamento estatístico, observou-se que as médias e os desvios padrão da Contagem Total de Enterobactérias estão agrupados em 12 grupos representativos dos boxes onde as amostras foram adquiridas.

Não houve diferença significativa entre os valores médios da Contagem de Enterobactérias encontrados entre os boxes estudados na Regressão Logística Simples quando estudados isoladamente ($p > 0,05$).

Tabela 2: Médias (\log_{10} UFC.g⁻¹) e Desvios Padrão (\log_{10} UFC.g⁻¹) dos valores encontrados na Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Enterobactérias agrupados em 12 boxes com 5 amostras cada.

BOXES	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva		Enterobactérias	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	1,48	1,37	3,90	0,92
2	1,42	1,94	4,46	0,68
3	0,64	1,43	4,00	0,53
4	2,38	1,45	4,88	1,02
5	3,20	0,80	4,16	1,05
6	3,02	1,86	4,84	0,84
7	1,98	1,82	4,52	0,84
8	3,10	0,64	4,36	0,70
9	1,80	1,69	3,94	0,56
10	1,56	1,50	4,86	1,32
11	2,06	2,23	4,60	0,58
12	2,06	0,32	4,18	0,32

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.1 Aferição da Temperatura

Na Tabela 3, considerando a pouca quantidade de gelo utilizada pelos funcionários dos boxes, somente 26,7% das amostras estavam dentro dos padrões exigidos para pescado resfriado que é de até 7°C.

Não houve diferença significativa entre os valores médios de temperatura encontrados entre os boxes estudados na Análise de Regressão Logística Simples ($p > 0,05$).

Conforme constam as Tabelas 3 e 10, os valores mínimo e máximo encontrados nas médias de temperatura foram respectivamente 7,8°C e 14,16°C e os encontrados nos desvios padrão foram 1,98°C e 7,09°C. Sendo o $p > 0,05$ e o valor $F = 0,8702$, a variação entre colunas não é significativamente maior que o esperado quando se aplica o Teste de Tukey, que é o teste de comparação entre todos os pares de colunas.

Quando relacionou-se a temperatura com crescimento de *Salmonella* spp. foi constatado que houve diferença estatística significativa. Ou seja, a probabilidade de isolar *Salmonella* spp. é maior quando os valores de temperatura encontram-se mais

baixos; afirmativa que pode ser comprovada pela equação: $\text{Logit} = 2,2396 - (0,13x_1)$, onde x_1 é a temperatura, p é igual a 0,0424 ($p < 0,05$) e o Odds Ratio = 0,8782 (Intervalo de Confiança = 0,775 - 0,900). Logo, com o decréscimo de 0,13, o risco de isolar *Salmonella* spp. aumenta em 0,88%.

O percentual de não conformidades, ou seja, o percentual de camarões expostos a temperaturas superiores a 7°C, foi de 73,3% (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão, número e percentual de não conformidades da temperatura.

BOXES	TEMPERATURA			
	Média	Desvio Padrão	Nº de não conformidades	Percentual de não conformidades
1	11,14	4,07	5	100%
2	11,0	6,61	3	60%
3	8,0	1,98	4	80%
4	12,20	3,48	5	100%
5	8,76	3,30	3	60%
6	10,46	4,35	4	80%
7	10,60	2,88	5	100%
8	11,40	6,42	4	80%
9	7,80	4,90	2	40%
10	14,16	7,09	4	80%
11	9,90	4,17	3	60%
12	7,86	3,17	2	40%
TOTAL				73,3%

4.2.2 Avaliação da Produção de Bases Voláteis Totais (BVT)

Somente 35% dos valores encontrados estavam dentro do limite preconizado que é de até 30mg N/100g (BRASIL, 1997b).

De acordo com a Tabela 4, o menor e o maior valor das médias da avaliação da produção de Bases Voláteis Totais foram respectivamente 27,21 mg de N - BVT/100g e 51,66 mg de N -BVT/100g e os encontrados nos desvios padrão foram 12,91 e 28,89. Tem-se o valor p , considerado não significativo ($p > 0,05$) e o valor $F = 0,6615$.

Não houve diferença significativa entre os valores médios de BVT encontrados entre os boxes estudados por Regressão Logística Simples ($p > 0,05$).

Houve significância estatística da avaliação da produção de BVT quando relacionada ao crescimento da *Salmonella* spp. e a equação encontrada foi $\text{Logit } \pi =$

2,0884 – (0,03 x_1), onde $p = 0,05$ e o Odds Ratio é igual a 0,9709. O valor de IC é (0,942-1,0). Sendo assim, com o decréscimo de 0,03, o risco ou a probabilidade de isolar *Salmonella* spp. é 0,9709.

Tabela 4: Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão, número e percentual de não conformidades de BVT.

BOXES	N-BVT (mgN/100g)			
	Média	Desvio Padrão	Nº de não conformidades	Percentual de não conformidades
1	36,92	18,07	3	60%
2	44,35	28,89	3	60%
3	48,76	23,57	4	80%
4	47,58	18,62	4	80%
5	38,68	14,22	3	60%
6	41,58	20,13	4	80%
7	42,59	18,77	4	80%
8	42,21	24,60	4	80%
9	27,21	16,12	1	20%
10	51,66	26,11	3	60%
11	44,98	16,42	4	80%
12	28,85	12,91	2	40%
TOTAL				65%

O percentual de não conformidades, ou seja, o percentual de camarões com valores de BVT superiores a 30mg N/100g foi de 65% (Tabela 4).

4.2.3 Determinação do pH

O valor médio de pH (tabela 5), considerando os 12 boxes estudados foi de 7,13. O menor e o maior valor de médias de determinação do pH por box foram respectivamente 6,98 e 7,26 e para desvio padrão foram 0,21 e 0,59 de acordo com a Tabela 5.

O valor ($p > 0,05$) e o valor $F = 0,2141$ denotam que não houve significância estatística dos resultados da *Salmonella* spp. quando relacionada com o pH, por Análise de Regressão Logística Simples.

Não foi observado diferença significativa entre os valores médios de pH encontrados entre os boxes estudados por Regressão Logística Simples ($p > 0,05$).

Dos 12 boxes analisados, somente 2 apresentam valores de pH entre 6,5 e 7,0, ou seja, 16,67% dentro da faixa de pH considerada aceitável para camarões resfriados e apresentaram indícios de deterioração (OLIVEIRA, 2005).

Tabela 5: Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão, além de número e percentual de não conformidades do pH.

BOXES	pH			
	Média	Desvio Padrão	Nº de não conformidades	Percentual de não conformidades
1	7,14	0,43	2/5	40%
2	7,18	0,43	3/5	60%
3	7,20	0,41	3/5	60%
4	7,08	0,50	3/5	60%
5	7,16	0,29	4/5	80%
6	7,12	0,43	3/5	60%
7	6,98	0,57	3/5	60%
8	7,26	0,21	5/5	100%
9	7,16	0,45	2/5	40%
10	7,26	0,27	4/5	80%
11	6,98	0,59	3/5	60%
12	7,10	0,51	4/5	80%
TOTAL				65%

O percentual de não conformidades, ou seja, o percentual de camarões com valores de pH superiores a 7,0 foi de 65% (Tabela 5).

4.2.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada

Tabela 6: Resultados positivos para Histamina obtidos na Avaliação da Produção de Cadaverina, Histamina e Putrescina, por CCD, em μL , detectados em 7 amostras.

Amostras	Aminas
23	cadaverina: n.d.; histamina: ~ 1 e putrescina: n.d.
25	cadaverina: n.d.; histamina: ~ 5 e putrescina: n.d.
26	cadaverina: n.d.; histamina: ~ 5 e putrescina: n.d.
27	cadaverina: n.d.; histamina: 5-10 e putrescina: n.d.
28	cadaverina: n.d.; histamina: 5-10 e putrescina: ~ 1
29	cadaverina: n.d.; histamina: 5-10 e putrescina: ~ 1
30	cadaverina: n.d.; histamina: ~ 5 e putrescina: ~ 1

Na tabela 6, encontram-se os resultados das sete amostras positivas para histamina.

Tabela 7: Frequência de cada amina biogênica ao longo dos 12 boxes analisados.

BOXES	Números das amostras em cada box	Frequência de cada amina biogênica
1	12, 16, 40, 44, 59	2C; 1P
2	1, 6, 24, 35, 47	2C; 4P
3	8, 36, 42, 51, 60	1C; 1P
4	3, 14, 22, 31, 38	4C; 1P
5	5, 33, 39, 53, 56	3C; 1P
6	2, 11, 26, 46, 50	2C; 1H; 1P
7	9, 25, 30, 45, 58	1C; 2H; 2P
8	10, 15, 32, 43, 57	3C
9	17, 29, 37, 41, 49	1C; 1H; 1P
10	7, 13, 20, 28, 55	2C; 1H; 2P
11	4, 21, 27, 34, 52	2C; 1H; 1P
12	18, 19, 23, 48, 54	1H; 2P

Legenda: C= Cadaverina; H= Histamina e P= Putrescina

Nos resultados encontrados na Tabela 7, pode-se observar a frequência de aparecimento de cada amina biogênica nos 12 boxes analisados. Nota-se que nos boxes 6, 7, 9, 10 e 11 houve detecção simultânea das três aminas biogênicas nas amostras, o que representa maior risco de intoxicação histamínica, visto que a cadaverina e a putrescina podem potencializar o efeito da histamina. Vale ainda ressaltar que em 50% dos boxes, houve detecção de histamina. As amostras 26, 29 e 30 ficaram muito próximas do limite máximo tolerado de 10 mg/100g e duas delas, a 27 e a 28 ultrapassaram esse valor.

4.2.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O valores mínimo e máximo das médias encontradas na determinação de TBARS foram respectivamente 0,14 mg de malonaldeído/Kg e 0,34 mg de malonaldeído/Kg e dos desvios padrão foram respectivamente 0,10 e 0,48 de acordo com a Tabela 8. O valor ($p > 0,05$) e o valor $F = 0,7633$.

Tabela 8: Distribuição por box dos resultados das médias e desvios padrão da análise de TBARS.

BOXES	TBARS	
	Média	Desvio Padrão
1	0,24	0,17
2	0,17	0,14
3	0,34	0,19
4	0,28	0,17
5	0,20	0,10
6	0,27	0,24
7	0,40	0,48
8	0,40	0,40
9	0,14	0,16
10	0,26	0,34
11	0,47	0,23
12	0,21	0,19

Não houve diferença significativa entre os valores médios de TBARS encontrados entre os boxes estudados ($p > 0,05$).

Não houve significância estatística dos resultados da *Salmonella* spp. quando relacionada com TBARS, por Análise de Regressão Logística Simples.

Como não há limite estabelecido pela Legislação Brasileira, apenas foram realizados média e desvio padrão dos valores obtidos nessa análise.

4.2.6 Identificação e Quantificação de Histamina pelo Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): Extração e Derivatização

Das 60 amostras, somente em sete foi detectada a presença de histamina e, como o Método da Cromatografia em Camada Delgada não é quantitativo, essas mesmas amostras foram submetidas ao método de CLAE.

Observado-se os resultados da CLAE, na Tabela 9, duas amostras encontram-se superiores ao padrão aceito de até 10 mg/100g e quatro permaneceram no intervalo entre 5 e 10 mg/100g e também devem ser levados em consideração, pois também podem representar risco à saúde dos consumidores pela presença concomitante de putrescina.

Tabela 9: Resultados da quantificação de Histamina por CLAE para sete amostras de camarão positivas pelo método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em seus diferentes dias de estocagem.

Número da Amostra	Histamina por CLAE (mg/100g)	Histamina por CCD	Dias de Estocagem
23	2,06	~1	103
25	5,94	~5	103
26	7,09	~5	110
27	13,40	5-10	110
28	18,49	5-10	110
29	7,95	5-10	110
30	8,83	~5	110

Tabela 10: Resultados dos valores de p e F para as análises realizadas.

Análises	Valores de (p>0,05)	Valores de F
<i>Staphylococcus</i>		
Coagulase Positiva	0,27	1,27
Enterobactérias	0,50	0,95
Temperatura	0,57	0,87
BVT	0,76	0,66
pH	0,99	0,21
Histamina	0,64	0,79
Cadaverina	0,71	0,72
Putrescina	0,49	0,97
TBARS	0,67	0,76

Os valores mínimo e máximo encontrados na avaliação da produção de histamina pelo método de CLAE foram respectivamente 2,06 mg/100g e 18,49 mg/100g como está demonstrado na Tabela 9. E ainda, fazendo-se o Teste de Concordância entre valores adotados na CCD e os valores da CLAE, nota-se que diferem expressivamente.

Pelos resultados contidos na Tabela 10 nota-se que não houve significância estatística dos resultados quando realizada Análise de Regressão Logística Simples.

Tabela 11: Equação, p, R (Coeficiente de Correlação Múltipla) e R² Coeficiente de Determinação Múltipla) de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, Enterobactérias com Físico-Químico e Enterobactérias com Aminoácidos Biogênicos.

Fatores de Risco	Modelos de Equação dos Valores de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva, Enterobactérias com Físico-Químico e Enterobactérias com Aminoácidos Biogênicos, p de significância, R e R ²
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	$(Y_S) = 1,3012 + 0,0057x_1 - 0,1506x_2 - 0,0031x_3 + 0,0019x_4$ (p= 0,0302; R= 0,26; R ² = 0,07)
Enterobactérias com Físico-Químico	$(Y_{EFQ}) = 4,1801 - 0,0955x_1 + 0,1058x_2 - 0,0097x_3 + 0,7524x_4$ (p= 0,0259; R= 0,47; R ² = 0,22)
Enterobactérias com Aminoácidos Biogênicos	$(Y_{EAB}) = 4,0234 + 0,1183x_1 + 0,1130x_2 - 0,1229x_3$ (p= 0,0000; R= 0,63; R ² = 0,40)

Legenda: x₁: pH; x₂: temperatura; x₃: BVT e x₄: TBARS

Na Tabela 11, estão listados os fatores de risco e seus respectivos modelos de equação, valores de p de significância, R e R². Nas três equações, o p < 0,05, ou seja, representa que há significância estatística. Na primeira equação, há correlação entre *Staphylococcus* Coagulase Positiva com pH e TBARS. Na segunda equação, Enterobactérias tiveram interferência de temperatura e TBARS. Na terceira equação, as Enterobactérias sofreram influência de pH e temperatura.

5 DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

5.1.1 Contagem de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva

A ocorrência de Bactérias *Staphylococcus* Coagulase Positiva em amostras de camarão é de interesse para saúde coletiva, uma vez que na legislação vigente (BRASIL, 2001), encontra-se o limite de 10^3 UFC/g de crustáceos *in natura* resfriados.

As contagens deste patógeno nos exemplares de camarão cru descascados e resfriados, obtidas neste estudo, tiveram médias variando de $0,64 \log_{10}$ UFC.g⁻¹ a $3,20 \log_{10}$ UFC.g⁻¹ e 43,4% das amostras, agrupadas por box, tinham ultrapassado o limite máximo permitido pela legislação.

O alto crescimento microbiano neste estudo pode ser atribuído à forma que essa matéria prima é oferecida, pois as bactérias se tornam mais aptas a iniciar o crescimento em temperaturas entre 7°C e 48°C (WHO, 2008), fato que ocorreu na maioria dos boxes, onde a quantidade de gelo foi insuficiente para manter a temperatura ideal de conservação em até 7°C. Por ser resistente ao estresse ambiental, Beirão et al. (2000) afirmaram que, sem refrigeração adequada, é possível que tenha sido iniciado o processo de produção de toxinas. Seu consumo pode ser um risco devido a probabilidade de ocorrência de gastroenterites (JAY, 2005b) porque a toxina enterotóxica, como afirma Riedel (1992) é termorresistente e a cocção durante o preparo do camarão não é capaz de eliminá-la.

5.1.2 Pesquisa de Bactérias do gênero *Salmonella* spp.

A temperatura próxima da ambiente nos casos em que a quantidade de gelo era insuficiente mais o pH acima da faixa compreendida entre 6,5 e 7,0 parecem ter favorecido o crescimento do referido microrganismo nas amostras conforme afirmam os pesquisadores da WHO (2008). De acordo com Jay (2005a), outro fator que deve ser levado em consideração é a etapa de descascamento que rompe o intestino e promove extravazamento do conteúdo intestinal com conseqüente contaminação fecal, *habitat* primário da *Salmonella* spp.

Outras possíveis causas de contaminação são a manipulação inadequada do camarão cru por pessoas contaminadas e manutenção do alimento por muitas horas fora de refrigeração, segundo afirmam respectivamente Gast e os pesquisadores da “ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD” (2003).

Mesquita et al. (1977) em avaliação bacteriológica do camarão *Macrobrachium rosebergii*, obtiveram 0% de incidência de *Salmonella* spp. nas 180 amostras, embora as mesmas tenham sido oriundas de tanques de Piscicultura, difere bastante do resultado encontrado no presente experimento.

Os dados obtidos nesta pesquisa foram maiores que os 1,6% de *Salmonella* spp. encontrados por Koonse et al. (2005), apesar de os pesquisadores terem trabalhado com camarões congelados provenientes de carcinicultura.

Duarte et al. (2010), obtiveram 2,8% (2/71) de incidência de *Salmonella* spp. em camarões congelados da região nordeste do Brasil, embora tenha usado técnica de isolamento diferente do presente trabalho.

Em discordância com o padrão exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) que é de ausência em 25g de crustáceos *in natura* resfriados e em concordância com Molins (2001) que confirmou a possibilidade de presença deste patógeno em águas marinhas poluídas e em pescado, a *Salmonella* spp. foi encontrada 70% do total das amostras deste experimento como foi demonstrado na Tabela 1.

5.1.3 Contagem Total de Enterobacteriáceas

Confirmando a informação que temperaturas superiores a 4-5°C favoreceriam o desenvolvimento de Enterobactérias, os resultados deste estudo concordam com os de Blickstad e Molin (1983) e Brenner (1992).

Em 100% das amostras houve crescimento de Enterobactérias, pois a etapa de descabeçamento, a retirada da casca com extravasamento de conteúdo intestinal e a própria manipulação parecem ter colaborado para esse expressivo resultado, fato também observado por Tornadijo et al. (2001).

Brandão (2007) relacionou a presença desses microrganismos ao fato das amostras analisadas não estarem sendo beneficiadas e comercializadas em condições de higiene e temperatura adequadas; afirmação que coincide com os dados observados neste estudo.

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

5.2.1 Aferição da Temperatura

Shamshad et al. (1990) relataram que a temperatura é uma variável crítica devido a inadequação da estocagem e neste trabalho foram presenciadas irregularidades na manutenção do camarão na fase de estocagem, como ausência de gelo, quantidade insuficiente de gelo em contato com este pescado, gelo apenas na porção inferior da pilha de camarões, camarões previamente pesados e embalados fora da refrigeração e flutuações na temperatura de estocagem que segundo Nickelson II et.al (2001) também são fatores que interferem na qualidade final da matéria-prima.

5.2.2 Avaliação da Produção de Bases Voláteis Totais (BVT)

Com referência a produção de BVT, foram encontrados neste estudo teores variando de 27,21 a 51,66 mg de N/100g e 35% das amostras fora do limite estabelecido pela legislação brasileira - 30 mg de N/100g (BRASIL, 1997b).

Os valores mais baixos são bem maiores que zero devido à presença de amônia no conjunto de BVT, pois esta substância se origina da degradação de nucleotídeos no pescado fresco. Porém, à medida que o pescado é degradado, ocorre um maior aumento no teor de BVT (PEREIRA, 2004).

Quanto aos valores de BVT, no final do experimento os valores se aproximaram do início de deterioração que é de 30mg/100g, conforme Ogawa e Maia (1999). De acordo com Brasil (1997b), 30mg/100g é o limite de aceitação de BVT para pescado.

Assim como ocorreu com este experimento, para justificar a significância estatística da avaliação da produção de BVT quando relacionada a *Salmonella* spp., Shamshad et al.(1990) avaliaram os níveis de BVT durante a estocagem sob diferentes temperaturas e observaram resultados quase duas vezes maiores, quando o camarão era armazenado à temperatura ambiente. Este rápido aumento de BVT em relação a elevadas temperaturas, parecia estar relacionado ao aumento na contagem microbiana e à atividade enzimática.

5.2.3 Determinação do pH

As amostras com valores de pH mais altos foram as mesmas que apresentaram valores elevados de temperatura. Essa afirmativa também foi corroborada por Oliveira (2005) que observou temperaturas elevadas acelerando o processo de deterioração do camarão através da aceleração do crescimento bacteriano e da velocidade de ação de enzimas tissulares.

Neste estudo, somente dois boxes (16,67%) apresentam valores de pH entre 6,5 e 7,0, valores encontrados por Oliveira (2005) para camarões frescos. Todas as amostras tiveram resultados em uma faixa de pH que favorece a multiplicação de *S. aureus*, que pode se multiplicar no intervalo compreendido entre 4,0 e 9,8 sendo ótima entre 6,0 e 7,0 de acordo com Jay (2005b) e também de *Salmonella* spp. cujo pH ótimo de crescimento é em torno de 7,0 segundo Franco e Landgraf (1996) e Jay (2005b).

Os resultados de Oliveira (2005), assim como os do presente experimento são inferiores aos encontrados por Moura et al. (2003) que trabalharam com camarões das espécies *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis* cujas variações ficaram no intervalo de pH entre 7,1 a 8,1, superando os aceitos pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1980), para pescado, que define pH máximo de 6,8 para a carne externa e 6,5 para a interna.

Oliveira (2005) também encontrou valores de pH para camarão descabeçado estocado em gelo (*Litopenaeus vannamei*) entre 6,75 a 7,24 e houve semelhança

em seus resultados com os encontrados neste experimento, pois esta foi uma das espécies analisadas. Moura et al. (2003) e Bailey et al. (1956) também adotaram parâmetros muito semelhantes aos da presente pesquisa; assim como Luna (1971) e Shamshad et al. (1990) que adotaram valores aceitáveis de pH até 7,2 e 7,6 respectivamente. Em contrapartida, Moura et al. (2003), por terem trabalhado com várias espécies, aceitaram valores de pH em uma faixa entre 6,75 e 7,6 dependendo da espécie. Mendes et al. (2005) admitiram valores de pH próximos a 7,8.

5.2.4 Avaliação da Produção de Histamina, Cadaverina e Putrescina pelo Método de Cromatografia em Camada Delgada

Neste estudo, apesar de ter sido detectada em sete amostras, o teor de histamina ficou dentro dos padrões de até 10 mg de histamina/100g.

Os valores encontrados em μL ou em mg de histamina/100g de amostra para histamina tiveram médias variando de 0 a 2,12 μL ; no caso da cadaverina, de 0 a 3,16 μL e putrescina de 0 a 3,22 μL .

Os resultados deste experimento são inferiores aos encontrados por Mendes et al. (2005) que não detectaram a produção de histamina durante o armazenamento porém, relatam valores de 5,7 e 6,9 mg.Kg^{-1} de putrescina e cadaverina respectivamente em camarões rosa. Porém, em se tratando de cadaverina, os resultados obtidos no presente estudo encontram respaldo no trabalho de Salazar et al. (2000), que entre outros produtos, realizou análises em camarão inteiro, e obteve por CLAE, uma média de 2 $\mu\text{g.mg}^{-1}$.

Após encontrar em peneídeos o valor de putrescina 1 mg.kg^{-1} , Benner et al. (2003) sugeriram putrescina como o melhor indicador de decomposição de camarões peneídeos armazenados em uma variedade gama de temperaturas (0°C a 36°C) e propôs a nível de putrescina de 3 mg kg^{-1} como limite para o ser humano de consumo. Comparando-se os resultados apresentados no seu trabalho de Avaliação de Putrescina, Cadaverina e Indol como Indicadores Químicos de Decomposição em Camarões Penaídeos com os obtidos neste estudo pode-se afirmar que os níveis encontrados são similares.

5.2.5 Determinação do Número de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados encontrados no presente experimento tiveram médias que variaram de 0,14 a 0,47 mg de malonaldeído/Kg e se encontram dentro dos parâmetros aceitos em outros trabalhos, que é de 3,0 mg de aldeído malônico/Kg. Esses resultados são bem inferiores aos encontrados por Moura et al. (2003), quando trabalharam com camarão rosa e relatam o registro de média de $1,31 \pm 0,69$ mg de aldeído malônico/Kg.

Os valores que mais se aproximaram dos relatados neste estudo foram os de Abreu (2006), 0,32 mg de malonaldeído/Kg em caudas de camarão não irradiadas.

Os níveis encontrados no presente estudo estão bem próximos aos relatados, para pescado comercialmente fresco, por Botsoglou et al.(1994).

5.2.6 Identificação e Quantificação de Histamina pelo Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Zhao et al. (2007) obtiveram, nos primeiros dias de estocagem, índices não detectáveis para histamina em camarões brancos. Mas, do quarto ao oitavo dia, esses valores variaram de 0,08 a 0,89 mg/Kg a 0 °C e, de 0,06 a 0,90 mg/Kg a 4 °C; todos bem abaixo dos obtidos neste trabalho.

Saaïd et al. (2009) na pesquisa de determinação de aminas biogênicas em pratos selecionados da Malásia, através do método de CLAE, obteve para camarão seco, o valor do teor de histamina de $2,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Esse valor equivale a 0,21 mg/100g é inferior aos encontrados nas sete amostras analisadas neste estudo, cujos valores variaram de 2,06 a 18,49 mg/100g.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, a qualidade do camarão disponível ao consumo apresentou-se insatisfatória, em função do percentual de amostras que mostraram não conformidade com os padrões oficiais para alguns parâmetros e pela presença de ranço e histamina, que além de indicarem perda de qualidade do produto, esses podem comprometer a saúde do consumidor.

Há necessidade de um maior controle e monitorização da temperatura do camarão descascado resfriado desde sua captura até o momento de comercialização, para que essa matéria prima apresente boa qualidade e não represente perigo de intoxicação ao consumidor.

Considera-se adequado, em um futuro estudo mais amplo, incluir a Pesquisa de Bactérias Produtoras de Histamina, Putrescina e Cadaverina às Análises Bacteriológicas e avaliar não só histamina, mas putrescina e cadaverina pelo Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Indica-se a contratação de técnico com formação específica com o objetivo de oferecer suporte técnico, implementação de monitoramento de temperatura durante o recebimento, a estocagem e a exposição para venda; sempre com o objetivo de melhorar as condições de temperatura e de conservação dos produtos.

Observando-se os resultados fora dos parâmetros preconizados do presente estudo, deve-se buscar a melhoria na qualidade dos produtos da pesca passando pela capacitação constante dos funcionários em boas práticas de fabricação, procedimentos padrões de higienização e análise de perigos e pontos críticos de controle para o mercado enfocado e/ou em carcinoculturas com especial atenção à etapa de refrigeração associados à adoção de medidas mais rigorosas pelos órgãos de fiscalização, no caso de estabelecimentos reincidentes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, v.123, n. 1-2, p. 121-129. 2008.

ABREU, V.K.G. *Efeito da Radiação Gama sobre a redução de microrganismos patogênicos, a estabilidade dos lipídios e as características sensoriais em caudas de camarões congelados*. Fortaleza, 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

ADAMS, A.M.; LEJA, L. L.; JINNEMAN, K.; BEEH, J.; YUEN, G.A.; WEKELL, M.M. Anisakid parasites, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in sushi and sashimi from Seattle area restaurants. *Journal of Food Protection*, v.57, n.4, p. 311-317, 1994.

AL-KAHTANI, H.A.; ABU-TARBOUSH, H.M.; BAJABER, A.S. Chemical changes after irradiation and post-irradiation storage in Tilapia and Spanish Mackerel. *Journal of Food Science*, v. 61, n. 4, p. 729-733, 1996.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em Queijo tipo “Frescal”. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 578-80, dez. 2000.”

ANIHOVI, V. B; SAKYI-DAWSON, E.; AYERNOR, G. S.; HOUNHOIGAN, J. D. Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for lanhouin production. *International Journal of Food Microbiology*, v. 116, n. 2, p. 287–291, 2007.

APHA. DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C., 2001. 335p.

ARAÚJO, J.M.A. *Química de Alimentos – Teoria e Prática*. 2. ed. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

ARNOLD, S.H.; BROWN, W.D. Histamine (?) toxicity from fish products. *Advances in Food Research*, v. 24, p. 113-154, 1978.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). A carcinocultura brasileira. *Revista da ABCC*, n.1, p.30-45, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). Análise da produção e do Mercado interno e externo do camarão cultivado. *Revista da ABCC*, n.1, p.18-23, 2010.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas*. Sociedade Civil Mamirauá: Belém, Pará-Brasil. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua. Belém, PA. 2007. 324p.

AYULO, A.M.; MACHADO, R.A.; SCUSSEL, V.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam: Elsevier Science, v. 24, n. 1-2, p. 171-178, 1994.

BAILEY, M. E.; FIEGER, E. A.; NOVAK, A. F. Objective test applicable to quality studies of ice stored shrimp. *Food Research*, Champaign, v.21, p.611-620., 1956.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, n.1, p. 1-10, 2000.

BARBIERI, R. C.; OSTRENSKY, A. *Camarões Marinhos – Engorda*. 2.ed. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2002. 337p.

BAUZA, T.; BLEISE, A.; DAUMAS, F.; CABANIS, J. C. Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallée du RhSne by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 707, n. 2, p. 373-379, 1995.

BEIRÃO, L. H.; TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M. Processamento e Industrialização de Moluscos. In: SEMINÁRIO E WORKSHOP TECNOLOGIAS PARA APROVEITAMENTO INTEGRAL DO PESCADO, 1., 2000, Campinas. *Anais...* Campinas: ITAL, 2000. p. 38-84.

BENNER, R. A. Jr.; STARUSZKIEWICZ, W.F.; ROGERS, P.L.; OTWELL, S. Evaluation of decomposition in penaeid shrimp. *Journal of Food Science*, v. 68, n. 7, p. 2178-2185, 2003.

BERSOT, L.S.; SÃO CLEMENTE, S.C.; SANTOS, N.N. Avaliação dos teores de histamina em sardinha enlatada (*Sardinella aurita*, Valenciennes, 1847). *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 10, n. 45, p. 38-43, 1996.

BERSOT, L.S. *Salmonella* no Brasil: sua importância o abate de aves. In: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 5., 2006. *Anais...* Santa Maria, RS, 2006, p. 90-94.

BERTULLO, V. *Tecnología de los productos y Subproductos de Pescados, Moluscos y Crustáceos*. Buenos Aires: Ed. Hemisferio Sur, 1975. 538p.

BHADURI, S., BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J. Expanded response surface model for predicting the effects of temperatures, pH, sodium chloride contents and sodium nitrite concentrations on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Journal Applied Bacteriology*, v. 79, p. 163-170, 1995.

BLICKSTAD, E; MOLIN, G. Carbon dioxide as a controller of the spoilage flora of pork with special reference of temperature and sodium chloride. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.46, p. 756-63, 1983.

BOTSOGLU, N. A.; FLETOURIS, D. J.; PAPAGEORGIU, G. E.; VASSILOPOULOS, V. N.; MANTIS, A. J.; TRAKATELLIS, A. G. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v.42, n. 9, p.1931-1937, 1994.

BRAGA, S.P.; GOMES, F.S.P.; SILVA, C.A.; SOUZA, S.E.L.; SOUSA, C.P. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17, 2000, Fortaleza. *Resumos*. Fortaleza: SBCTA, 2000. v. 1, p. 4-80.

BRANDÃO, W.N. Beneficiamento de camarões marinhos. *Rede de Tecnologia da Bahia – RETEC/BA*, 2007. 25p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº1255, de 25 de jun 1962. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, Brasília. 166p. 1980.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo decreto nº 1255 de 25 de junho de 1962, nº 1.236 de 02 de setembro de 1994, nº 1.812 de 08 de fevereiro de 1996 e nº 2.244 de 04 de junho de 1997. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – R.I.I.S.P.O.A. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 1997a.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MAPA nº 185, de 13 de Maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). *Diário Oficial da República Federativa da União*, Brasília, 19 maio de 1997b.

_____. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. Pescado Fresco. *Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento*, Brasília, DF, v. 2, cap. 11, 1981.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.hidrolabor.com.br/RDC12.pdf>>. Acesso em: 19 maio 2009.

_____. Instrução Normativa SDA nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficialização dos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, com seus respectivos capítulos e anexos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, p. 14, 18 set. 2003. Seção 1.

_____. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 816p., Normas e Manuais Técnicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf>. Acesso em 17 jan. 2011.

_____. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. *Análise Epidemiológica de Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil*, 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

BRENNER, D.J. Introduction to the family *Enterobacteriaceae*, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). *A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. 2 ed. New York: Springer Verlag, 1992. 156p. p. 2673-2695.

BYSTED, J.; SWENNE, L.; AAS, H.W. Determination of trymethylamine oxide in fish muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 10, p. 301-304, 1959.

CADUN, A.; CAKLI, S.; KISLA, D. A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry*, London, v. 90, n. 1-2, p. 53-59, 2005.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, M.B.M.; CAMPOS, L.C.; GOMPERTZ, O.F.; RÁCZ, M.L. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p., cap. 43, p. 319-328.

CARDONHA, A.M.S.; CASIMIRO, A.R.S.; VIEIRA, R.H.S.F. Identificação de bactérias psicrófilas em caudas de lagosta, durante processo industrial com tripolifosfato de sódio. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 8, n.31, p. 29-34, 1994.

CASSAROLA, R.S.; CASTRO, E.B.V.; RODRIGUES JR., C. E.; REINECKE, W.; BREYER, E.B. *O impacto da carcinicultura nas áreas de proteção ambiental federais costeiras do nordeste brasileiro*. In: Anais do IV Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, n. 1, p. 406-416. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Rede Nacional Pró Unidades de Conservação, Curitiba, PR. 2004.

CENCI-GOGA, B.T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P.V.; MORGANTE, R.A.; CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *Journal of Food Protection*, v.66, p.1693-1696, 2003.

CENTERS FOR DISEASE, CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Disease Listing (Typhoid Fever)*. Out. 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/typhoidfever_t.htm>. Acesso em: 22 jan. 2009.

CINTRA, I.H.A.; OGAWA, N.B.P.; SOUZA, M.R.; DINIZ, F.M.; OGAWA, M. Decomposition of trimethylamine oxide related to the use of sulfites in shrimp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas: SBCTA, v. 19, n. 3, 1999.

CONSTANTINIDO, G. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. Apresentado no 1º Seminário de Vigilância Sanitária Pesqueira: Qualidade do Pescado. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 8, n. 32, p. 5-6, 1994.

CONTE JUNIOR, C.A.; HIERRO, E.; ALVAREZ, M.F. Estudio de la producción de poliaminas por bacterias comensales aisladas de leche humana. In: CONGRESO ESPAÑOL DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, 15, 2006, Ourense. *Anais...* Ourense: Sociedade Española de Microbiología, 2006. p.75

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. *Bioquímica de pescados e derivados*. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409p.

CONWAY, E.J.; BYRNE, A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I. The micro-determination of ammonia. *Biochemistry Journal*, v. 27, n. 2, p. 419-429, 1993.

COX, N. A.; MERCURI, A. J. Comparison of two minikits (API and R-B) for identification of Enterobacteriaceae isolated from poultry and meat products. *Journal of Food Protection*, v. 41, n. 2, p.107-110, 1978.

DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.73, n. 21, p. 1035-1145, 1992.

DE LAS RIVAS, B.; MARCOBAL, A.; CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R. PCR detection of food bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 2509–2514, 2006.

DONINI, C.A.; GERMANO, M.I.S.; MIGUEL, O.; GERMANO, P.M.L. Pescado, Cólera e Saúde Pública. *Revista da Comunidade Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Universidade de São Paulo, v. 17, n. 1-2, p. 25-32, 1993

DOYLE, M.P. Foodborne bacterial pathogens. In: HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A. et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed. Maryland: Williams & Wilkins, 1994. 1106p.

DU, W.X.; LIN, C.M.; PHU, A.T.; CORNELL, J.A.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Food Microbiology and Safety*, v. 16, n. 1, p. 292-301, 2002.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SILVA, J.V.D.; DE ANDRADE, P.L.A.; SANTANA, A.A.P. Ocorrência de *Salmonella* spp e *Staphylococcus* Coagulase Positiva em Pescado no Nordeste, Brasil. *Arquivo do Instituto Biológico*, v. 77, n.4, p. 711-713, out-dez., 2010.

DYER, W.J. Amines in fish muscle. I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *Journal of the Fish Research Board of Canada*, v. 6, n.5, p. 351-358, 1945.

EMBORG, J.; LAURSEN, B.G.; DALGAARD, P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacores*) at 2°C – effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, n. 101, n. 3, p. 263-279, 2005.

EUZÉBY, J.P. *List of bacterial names with standing in nomenclature*. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 11 out. 2011.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Departamento de pesca y acuicultura. El estado mundial de La pesca y La acuicultura, 2006. Disponível em: <<http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699s/a0699s.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2008.

_____. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. *Electronic Publishing Policy and Support Branch*. Fisheries and Aquaculture Department, Rome. 176p. 2009.

_____. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) 2010. Fishery Information, Data and Statistics Unit. *FishStat plus: universal software for fishery statistical time series*. Version 2.3. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>. Acesso em: 20 de agosto de 2010.

FARMER, J. J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; TOLKEN, R. H. *Manual of Clinical Microbiology*. 8. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003. 2322p. p. 636–653.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide. Washihgton, D.C.: Office of Seafood. 1996, 244p.

_____. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Scombrototoxin (histamine) formation. Ch. 7. In: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. 3. ed., p. 83-102. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC, 2001 Disponível em:<<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4.html>>. Acesso em: 22 ago. 2007.

_____. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance, 3.ed. cap. 7. jun. 2006. Disponível em: < <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/ucm091910.htm>>. Acesso em: 25 jan 2011.

FERNANDES, L.M.R. *Chamada Pública MCT/FINEP/AL – CARCINICULTURA 09/2010* – Seleção Pública de Propostas para Apoio à Pesquisa a Projetos de Redes Temáticas em Carcinicultura. Disponível em: www.finep.gov.br/fundos_setoriais/acao.../Recarcina_2010%203ago.pdf. Acesso em: 18 dez 2010.

FLICK, G. J.; LOVELL, R. T. Post-mortem biochemical changes in the muscle of gulf shrimp, *Penaeus aztecus*. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 37, n. 4, p.609-611, 1972.

FLORES, S. C.; CRAWFORD, D. L. Postmortem quality changes in iced pacific shrimp (*Pandalus jordani*). *Journal of Food Science*, Chicago, v. 38, n. 4, p. 575-579, 1973.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia de Segurança Alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

GALLARDO, J.M.; PEREZ-MARTIN, R.I.; SOTELO, C.G.; AUBOURG, S.; BANGA, J.R. Nota. Evolución de aminas volátiles en dos tipos de merluza (*Merluccius australis* y *Merluccius capensis*) y en rosada (*Xiphirus capensis*) durante el almacenamiento a – 18°C. *Revista Agroquímica de Tecnología de Alimentos*, v. 31, n. 1, p. 103-110, 1990.

GARRITY, G.M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. ed. Hardcover: Springer, 2005. 2816 pages; vol. 2 (Parts A, B and C).

GAST, R.K. Paratyphoid infections. In: BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R.; MC DOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. *Diseases of Poultry*. 11. Ed. Iowa, EUA: Iowa State Press, p. 567-583, 2003. Seção 2, cap. 16. CD-ROM.

GERMANO, P.M.L.; OLIVEIRA, J.C.F.; GERMANO, M.I.S. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 7, n. 28, p. 40-45, 1993.

GERMANO, P.M.L.; MIGUEL, O.; GERMANO, M.I.S. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 7, n. 27, p. 6-11, 1993.

GLEDEL, J. Las *Salmonellas*. In: BOURGEOIS, C. M.; MESCLA, J. F.; ZUCCA, J. *Microbiología Alimentaria*. Espanha: Acribia, 1994. 676p. cap. 1, p. 53-66.

GRAU, F.H. Role of pH, lactate and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative Gram-negative bacteria on beef. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v. 42, n. 6, p. 1043- 1050, dez. 1981.

GUZMÁN, E. C. *Bioquímica de Pescados e Derivados*. Jaboticabal: Funep, 1994, 409p.

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, n. 2, p. 42-49, 1994.

HOFFMAN, F.L. Levantamento da qualidade higiênico-sanitária de pescado comercializado na cidade de São José do Rio Preto (SP). *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 13, n. 64, p.45-48, 1999.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, cap. 17, p. 527-558. 787p. 2008.

HUANG, C.H.; LAI, H.T.; WENG, Y.M. Suitability of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) muscle for gel formation. *International Journal of Food Science and Technology*, n. 33, p. 339-344, 1998.

HUSS, H.H. Assessment of fish quality. In: _____. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical Paper*, n. 348, Rome, 1995.

HUSS, H.H. *Garantia da Qualidade dos Produtos da Pesca*. Roma: FAO, 1997. (FAO Documento Técnico Sobre as Pescas 334). Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768P/T1768P01.htm>>. Acesso em: 04 abr 2006.

_____. *Garantia da Qualidade dos Produtos da Pesca*. Roma: FAO, 1997. (FAO Documento Técnico sobre as Pescas 34). Disponível em: <<http://www.fao.org/DOCREP/003/T1768P01.htm>>. Acesso em: 18 dez 2010.

_____. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. *FAO documentos técnicos de pesca – T348*. Dinamarca, v. 7180/s, p. 202, 1999.

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

JACOBBER, L.F.; RAND, A.G.J. Biochemical evaluation of seafood. In: MARTIN, R.E.; FLICK, G.J.A; HEBARD, G.E; WARD, D.R. *Chemistry and biochemistry of marine food products*. Connecticut: Westport, cap. 16, p. 347-366, 1982.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A.; TAVECHIO, A. T.; SAKUMA, H.; PAULA, A. M.; GELLI, D. S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de

Salmonella spp. ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Revista Instituto Adolf Lutz*. São Paulo, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p. 12–18, 2006.

JAY, J. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1992. 804p.

JAY, J.M. Frutos do Mar. In: JAY J.M. Editor. *Revista Microbiologia de Alimentos*, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p.119-28, 2005a.

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005b. 711p.

KAI, M.; MORAES, C. *Vias de deterioração do pescado*. Seminário sobre Controle de qualidade na indústria de pescado. Instituto de Tecnologia de Alimentos, São Paulo, 1988.

KE, P.J.; CERVANTES, E.; ROBLES-MARTINEZ, C. Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in fish tissue by an improved distillation – spectrophotometric method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 35, N. 11, p. 1248-1254, 1984.

KIETZMANN, U.; PRIEBE, K.; RAKOW, D.; REICHSTEIN, K. *Inspeccion Veterinaria de Pescados*. 1. ed. Espanha: Acribia, p. 326, 1974.

KOONSE, B.; BURKHARDT III, W.; CHIRTL, S.; HOSKIN, G. *Salmonella* and sanity quality of aquacultured shrimp. *Journal of Food Protection*, v.68, n. 12, p. 2527-2532, 2005.

KUNG, H.F.; LEE, Y.H.; CHANG, S.C.; WEI, C.I.; TSAI, Y.H. Histamine contents and histamine-forming bacteria in sufu products in Taiwan. *Journal of Food Control*, v. 18, n. 5, p. 381-386, 2007.

LAKSHMANA, R.; SHAKILA, R.J.; JEYASEKARAN, G. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Journal of Food Microbiology*, n. 19, p. 617-25, 2002.

LEE, K. T.; YOON, C.S. Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0°C. *Meat Science Journal*, Barking, v. 59, p. 71–77, 2001.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Review: Histamine fish poisoning revisited. *Internacional Journal of Food Microbiology*, v. 58,n. 1-2, p. 1-37, 2000.

LIMA, F.C. Víbrios marinhos: *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v.11, n. 47, p.14-22, 1997.

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. *Bol. SBCTA*, v. 33, n.1, p. 70-79, 1999.

LOPÉZ-SABATER, E.I.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J.J.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; MORA-VENTURA, M.A.T. Bacteriologic quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning: effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. *Journal of Food Protection*, v. 57, n. 4, p. 318-323, 1994.

LUNA, G. A. L. Cambios quimicos y microbiologicos en la decomposicion de camarones (*Penaeus brasiliensis*). Control de calidad para muestras del mercado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Caracas, v. 3, p. 381-400, 1971.

LUVESUTO, E.; FREITAS, P.D.; GALETTI, P.M. Genetic variation in a closed line of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, n. 4, p.1156-1160, 2007.

MACEDO, M.V. de A. A retomada do desenvolvimento do setor pesqueiro nacional. Brasília, *Grupo Executivo do Setor Pesqueiro (GESPE)*, 1996.

MARCOS, L.; MAQUEDA, N. *Guía de Buenas Prácticas para la conservación de los crustáceos*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2003. 318p.

MATSUMOTO, M.; YAMANAKA, H. Post-mortem Biochemical changes in the muscle of Kuruma Prawn during storage and evaluation of the freshness. *Nippon Suisan Gakkaishi*. Japan, v. 56, n. 7, p. 1145-1149, 1990.

MAVROMATIS, P.; QUANTICK, P. Modification of Niven's Medium for enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 3, p. 546-551, 2002.

MEI, Y.H. A sensitive and fast method for the determination of polyamines in biological samples. Benzoyl chloride pre-column derivatization high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 17, n. 11, p. 2413-2418, 1994.

MENDES, R.; GONÇALVES, A.; PESTANA, J.; PESTANA, C. Indole production and deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) decomposition. *European Food Research and Technology*, v. 221, n. 3-4, p. 320-328, 2005.

MENOZZI, M.G.; EIGNER, U.; COVAN, S.; ROSSI, S.; SOMENZI, P.; DETTORI, G.; CHEZZI, C.; FAHR, A.M. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 11, p. 4085-4097, 2006.

MERCK. *Microbiology Manual Culture Media*. Dormstadt, Germany, 405p. 1996.

MESQUITA, A.J.; SILVA, P.C.; NUNES, I.A.; NICOLAU, E.S.; GUIMARÃES, P.L.S.N. Qualidade Bacteriológica de Camarões Gigantes da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*) cultivados com Dejetos de Aves. *Anais da Escola de Agronomia e Veterinária*, v. 27, n. 1, p. 1-6, 1997.

MIDURA, T.F.; BRYANT, R.G. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4.ed. Washington, APHA, 2001. 676p. cap. 2, p. 13-23.

MOLINS, R.A. Irradiación de los alimentos: principios y aplicaciones. Trad. Alberto Ibarz Ribas. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001. 490p. Tradução de: *Food Irradiation: principles and applications*.

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

MOSSEL, D.A.A.; QUEVEDO, F. *Control microbiológico de los alimentos: métodos recomendados*. Lima, Universidade Nacional Mayor de San Marcos, 1967. 96p.

MOTULSKY, H. J. INSTAT. *InStat 3.0 Program*. InStat guide to choosing and interpreting statistical tests. GraphPad Software, Inc., San Diego California USA. 1998. 126p. Disponível em: <www.graphpad.com>. Acesso em: 07 mar 2011.

MOTTA, M. R. A.; BELMONT, M. A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializadas em supermercados da região Oeste de São Paulo. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 11, n. 78-79, p. 59-62, 2000.

MOURA, A.F.P.; MAYER, M.B.; LANDGRAF, M.; TENUTA FILHO, A. Qualidade química e microbiológica de camarão-rosa comercializado em São Paulo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 2, abr-jun. 2003.

MOURÃO, J.O.B.; PIRES, K.M.S.; SOUSA, M.B.; VIANA, F.A.; SAKER- SAMPAIO, S. Estudo preliminar sobre a ocorrência de histamina em macroalgas marinhas do Estado do Ceará. *Revista Ciência Agronômica*, v. 38, n. 1, p. 64-68, 2007.

MURRAY, P.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M.; ROSENTHAL, K. *Medical Microbiology*. EUA: Mosby-Year Book, 1994. 775 p.

NAGUIB, K.; AYESH, A.M.; SHALAGY, A.R. Studies on the determination of biogenic amines in foods. 1. Development of a TLC method for the determination of eight biogenic amines in fish. *Journal of Agriculture in Food Chemistry*, v. 43, n.1, p. 134-139, 1995.

NETTO, F.M. *Modificações químicas, bioquímicas e sensoriais do híbrido de tilápia estocado em gelo*. Dissertação de Mestrado apresentada na Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP, Campinas, 1984.

NG, L.-K.; STILES, M. E. Enterobacteriaceae in ground meats. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 24, n. 12, p.1574-1582, 1978.

NICKELSON II, R.; McCARTHY, S.; FINNE, G. Fish, Crustaceans and Precooked Seafood. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. *Compendium of methods for the microbiological*

examination of foods. 14.ed. American Public Health Association, 2001. cap. 48, p. 497-504.

NORT, E. Importância do controle físico na qualidade do pescado. *Controle de Qualidade do pescado*. Santos: Loyola, 1988, p. 135-144 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

NUCERA, D.M.; MADDOX, C.W.; HOIEN-DALEN, P.; WEIGEL, R.M. Comparison of API 20E and invA PCR for identification of *Salmonella* enteric isolates from swine production units. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 9, p. 3388-3390, 2006.

NUNES, A.M.N. Qualidade do pescado é fator primordial para o prestígio do setor. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 8, n. 32, p. 6-7, 1994.

OETTERER, M. *Tecnologia de Pescado*. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. Disponível em: www.esalq.usp.br/departamentos. Acesso em 20 set 2008.

OGAWA, M. Microrganismos do pescado. In: OGAWA, M., MAIA, E.L. (org) *Manual de Pesca: Processamento do pescado*. 2. ed. São Paulo: Varela, p. 141-156, 1999.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. *Manual de pesca: Ciência e Tecnologia do Pescado – Volume I*. Ed. Varela. São Paulo, 1999.

OLIVEIRA, V.M. Estudo da qualidade do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), inteiro e descabeçado, estocado em gelo. Niterói, 2005. 90f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis. *Publicación científica y técnica*. 3. ed., v. 1, n. 580, p. 240-253, 2003.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, C.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 655-663, São Paulo, jul-ago, 2005.

PAN, B.S.; JAMES, D. Histamine in marine products: production of bacteria measurement and prediction of formation. *FAO Fisheries Technical Paper*, n. 252, 62p. 1985.

PAREDES, L.E. Aspectos Sanitários do cultivo do camarão marinho no Equador. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 7, n. 28, p.8-10, 1993.

PEDROSA, L.F.C.; COZZOLINO, S.M.F. Composição Centesimal e de Minerais de Mariscos Crus e Cozidos da Cidade de Natal/RN. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas: v. 21, n. 2, p. 154-157, maio-ago 2001.

- PEDROSA-MENABRITO, A.; REGENSTEIN, J.M. Shelf-life extension of fresh fish – A review Part I – Spoilage of fish. *Journal of Food Quality*, v. 11, n. 2, p. 117-127, 1988.
- PENNEY, N.; HAGYARD, C.J.; BELL, R.G. Extension of shelf life of chilled sliced roast beef by carbon dioxide packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 28, n. 2, p. 181-91, 1993.
- PEREIRA, W.D.; ATHAYDE, A.H.; PINTO, K.P. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na Cidade de Maceió – AL. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 15, n. 84, p. 67-74, 2001.
- PEREIRA, A.G.F. *Avaliação de condições de consumo da sardinha fresca, descongelada e processada através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e do nitrogênio de bases voláteis totais*. São Paulo, 2004. 61f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- PETRIDIS, K. D.; STEINHART, H. Biogene Amine in der Hartka "se-Produktion: II. Stufenkontroll-Studie einer standardisier-ten Emmentalerka"se-Produktion. *Dtsche. Lebensm.-Rundsch* v.5, p.142–146, 1996.
- PIGNATO, S.; MARINO, A.M.; EMANUELE, M.C.; IANNOTTA, V.; CARACAPPA, S.; GIAMMANCO, G. Evaluation of New Culture Media for Rapid Detection and Isolation of Salmonellae in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 5, p. 1996-1999, maio. 1995.
- RAMOS, E. Camarão volta aos bons tempos. *Gazeta Mercantil*, São Paulo, 04 mar. 2009. Disponível em: <<http://indexet.gazetamercantil.com.br/arquivo/2009/03/04/421/Camarao-volta-aos-bons-tempos.html>>. Acesso em: 25 maio 2009.
- REAY, G.A.; SHEWAN, J.M. The spoilage of fish and its preservation by chilling. *Advances in Food Research*, v. 2, p. 344-397, 1949.
- RIECHE, F.C.; MORAES, J.E.M.M. In: III Simpósio internacional sobre a indústria do camarão cultivado, realizado em paralelo à realização da terceira edição da Feira Nacional do Camarão (FENACAM), Natal, 2006. *Rev. BNDES*, v.13, n. 26, p. 309-314, 2006.
- RIEDEL, G. *Controle sanitário de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320p.
- RODRÍGUEZ, S.C.; LÓPEZ, B.; CHAVES, A.R. Effect of different treatments on the evolution of polyamines during refrigerated storage of eggplants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 10, p. 4700-4705, 2001.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, p. 489–499, 2004.

SAAID, M.; SAAD, B.; HASHIM, N.H.; ALI, A.S.M.; SALEH, M.I. Determination of Biogenic amines in selected Malaysian food. *Journal of Food Chemistry*, v. 113 n. 4, p. 1356-1362, 2009.

SALAZAR, M.T.; SMITH, T.K.; HARRIS, A. High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Biogenic Amines in Feed Stuffs, Complete Feeds and Animal Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 5, p. 1708-1712, 2000.

SALES, R.O. Avaliação do estado de frescor do pescado capturado em água doce e mantido sob refrigeração, no açude de Orós, Ceará. *Revista Ciência Agronômica*, v. 19, n. 2, p. 109-115, 1988.

SCHUTZ, D.E.; CHANG, G.W.; BJELDANES, L.F. Rapid thin layer chromatographic method for the detection of histamine in fish products. *Journal of the AOAC*, v. 59, n. 6, p. 1224-1225, 1976.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SHAMSHAD, S.I.; KHER-UN-NISA; RIAZ, M.; ZUBERI, R.; QADRI, R.B. Shelf life of shrimp (*Penaeus merguensis*) stored at different temperature. *Journal of Food Science*, v. 55, n. 5, p. 1201-1205. 1990.

SHARAF, O. M.; ABDALLA, E. A. M.; EL-SHAFEI, K.. Clostridia, *Enterobacteriaceae*, enterococci and its relation to biogenic amines content in Egyptian marketed Ras cheese. *Egyptian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 1, p.129–140, 1997.

SHINOHARA, N.K.S.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.D.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência e saúde coletiva*, Rio de Janeiro, RJ, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SHOJAEI, H; SHOOSHTARIPOOR, J; AMIRI, M. Efficacy of simple hand-washing in reduction of microbial hand contamination of Iranian food handlers. *Food Research International*, v. 39, n. 5, p. 525-529. 2006.

SILVA, C.C.G.; PONTE, D.J.B.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E. Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. *Journal of Food Science*, v. 63, n. 4, p. 644-647, 1998.

SILVA, J. A. *Tópicos da Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2000. p. 227. 232p.

SIKORSKI, Z. E. *Tecnología de los productos del mar*. Espanha: Acribia, 1994, p. 330.

SILVEIRA, N.F.A.; LEITÃO, M.F.F.; BALDINI, V.L.S.; TEIXEIRA FILHO, A.R. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 4, p.19-25, 2001.

- SILVEIRA, N.F.A.S. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre. Campinas, 2002. 69f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- SIQUEIRA, A.A.Z.C. *Efeitos da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da tilápia (Oreochromis niloticus)*. Piracicaba, 2001. 137f. Dissertação apresentada a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- STILES, M. E. and NG, L.K. Enterobacteriaceae Associated with Meats and Meat Handling. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 867-872, 1981.
- STRATTON, J. E.; HUTKINS, R. W.; TAYLOR, S. L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: A review. *Journal of Food Protection*. v. 54, p. 460-470, 1991.
- SOARES, V.F.M.; VALE, S.R.; JUNQUEIRA, R.G.; GLÓRIA, M.B.A. Teores de histamina e qualidade físico-química e sensorial de filé de peixe congelado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 18, n. 4, p. 462-467, 1998.
- SOCOL, M.C.H. *Otimização da vida útil da tilápia cultivada (Oreochromis niloticus), minimamente processada e armazenada sob refrigeração*. Piracicaba, 2002. 124f. Dissertação (Mestrado em Agroindústria, Alimentos e Nutrição) - Instituto de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SOTELO, C.G.; GALLARDO, J.M.; PINEIRO, C.; PÉREZ-MARTIN, R. Trimethylamine oxide and derived compounds changes during frozen storage of hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chemistry*. Vigo: Instituto de Investigaciones Marinas, v. 53, n. 1, p. 61-65, 1995.
- STONE, H.; SIDEL, J.L. Introduction to sensory evaluation. In: _____ *Sensory Evaluation Practices*. 2.ed. Redwood City (Califórnia): Academic Press, Inc. Série Food Science and Technology. cap. 1, p. 1-17. 338p.1993.
- TAHA, P. Controle de qualidade do pescado exercido pela Weg Penha Pescados S.A. *Controle de Qualidade do pescado*. Santos: Loyola, 1988, p. 210-215 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).
- TAMIM, N. M. BENNETT, L. W.; SHELLEM, T. A.; DOERR, J. A. High-Performance liquid chromatography determination of biogenic amines in poultry carcasses. *Journal of agriculture and food Chemistry*, v. 50, n. 18, p. 5012-5015, 2002.
- TAUXE, RV. Emerging Foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v. 78, n. 1-2, p. 31-41. 2002.
- TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, D.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São

Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, n. 5, p. 315-322, 1996.

TAYLOR, S. L. Other Microbial Intoxications. In: CLIVER, D. O. *Foodborne Diseases*. San Diego: Academic Press, Inc., cap. 9, pt. 3, p. 164-168, 1990. 393p.

TAVARES, M.; AUED, S.; BACETTI, L. B.; ZAMBONI, C. Q. Métodos sensoriais, físicos e químicos para análise de pescado. *Controle de Qualidade do pescado*. Santos: Loyola, 1988, p.117-134 (Trabalhos apresentados no SEMINÁRIO SOBRE CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PESCADO).

TAVARES, M.; MENDONÇA JR., J.B. Introdução de Crustáceos Decápodes Exóticos no Brasil: uma Roleta Ecológica. In: *Água de Lastro e Bioinvasão*. Rio de Janeiro (Editora Interciência): cap. 6, p. 59-76, 224p. 2004.

TEIXEIRA, C.G. Produtos alimentícios da atividade pesqueira. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v.7, n. 28, p.24-26, 1993.

THRUSFIELD, M. *Veterinary Epidemiology*. 2. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2003. 483p.

TIMM, M.; JORGENSEN, B.M. Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food Chemistry*, Denmark, v. 76, n. 4, p. 509-518, 2002.

TORNADIJO, M.E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J.M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology*, London, v.18, n. 5, p. 499-509, 2001.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

TAI, Y.H.; LIN, C.Y.; CHANG, S.C.; CHEN, H.C.; KUNG, H.F.; WEI, C.I. et al. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Journal of Food Microbiology*, v. 22, n. 5, p. 461-467, 2005.

TAI, Y.H.; CHANG, S.C.; KUNG, H.F. Histamine contents and histamine-forming bacteria in natto products in Taiwan. *Journal of Food Control*, v. 18, n. 9, p. 1026-1030, 2007.

UNIÃO EUROPÉIA. Comissão: Decisão da comissão de 16 de Outubro de 2006, relativa a medidas de emergência aplicáveis aos produtos da pesca importados do Brasil e destinados ao consumo humano. *Jornal oficial da União Européia*. Disponível em: <<http://eurex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:287:0034:0035:PT:DF>>. Acesso em: 15/04/2009.

VAN, T. T. H.; CHIN, J.; CHAPMAN, T.; TRAN, L. T.; COLOE, P. J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic

resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*. v.124, n. 3, p.217–223. 2008.

VIEIRA, R.H.S.F. *Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática*. São Paulo: Varela, 2004. 380p.

VOOYS, C.G.N. Occurrence and role of a Quaternary base, trimethylamine oxide, in two cockle species, *Cerastoderma edule* and *Cerastoderma lamarcki*. *Journal of Sea Research*, v. 76, n. 4, p. 69-73, 2002.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*, Leinfelden, v. 72, n. 12, p.1084-1087, 1970.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Foodborne disease outbreaks*. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008. 152p.

YAMAGATA, M.; LOW, L.K. Banana shrimp, *Penaeus merguensis*, quality changes during ice and frozen storage. *Journal of Food Science*, v. 60, n. 4, p. 721-726. 1995.

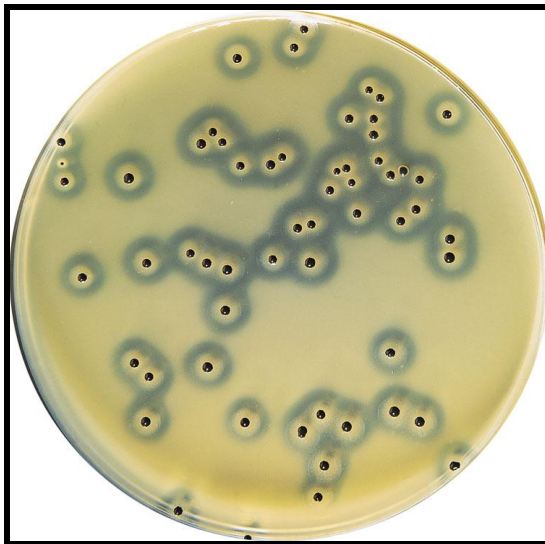
YOKOYAMA, V.A. *Qualidade do camarão da espécie *Xyphopenaeus kroyeri* mediante a ação dos agentes antimelanócitos*. Piracicaba, 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. 124f.

ZHAO, Q.-X.; XU, J.; XUE, C.-H.; SHENG, W.-J.; GAO, R.-C.; XUE, Y.; LI, Z.-J. Determination of biogenic amines in squid and white prawn by high performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 8, p. 3083-3088, 2007.

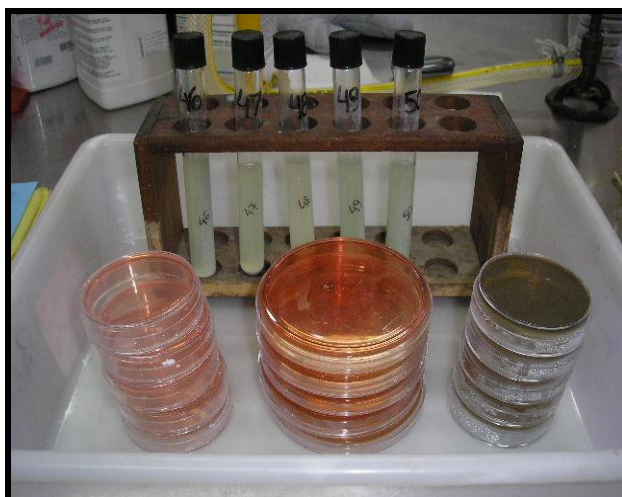
ZICAN, C.A. O Ministério da Agricultura iniciou o controle sanitário através do sistema de pontos críticos. O pescado é o carro chefe desse sistema. Apresentado no 1º Seminário de Vigilância Sanitária Pesqueira: Qualidade dos Pescados. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo: GT Editora, v. 8, n. 31, p. 9-10, 1994.

8 APÊNDICES

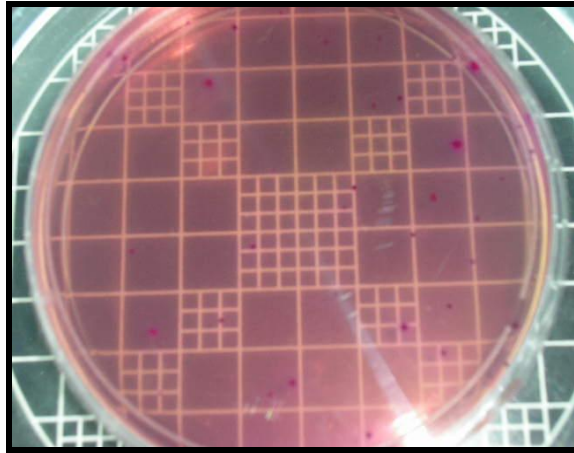
8.1 COLÔNIAS DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM PLACA



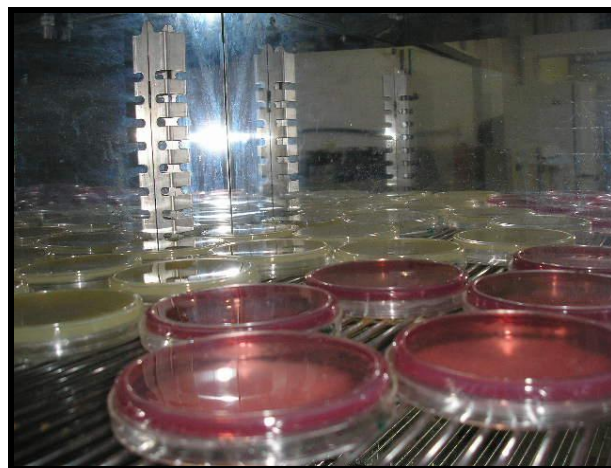
8.2 TUBOS DE ENSAIO COM MEIO SALMOSYST E TRÊS MEIOS DE CULTURA PARA ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp. (da esquerda para direita): ÁGAR SALMONELLA DIFERENCIAL, ÁGAR VERDE BRILHANTE E ÁGAR HEKTOEN



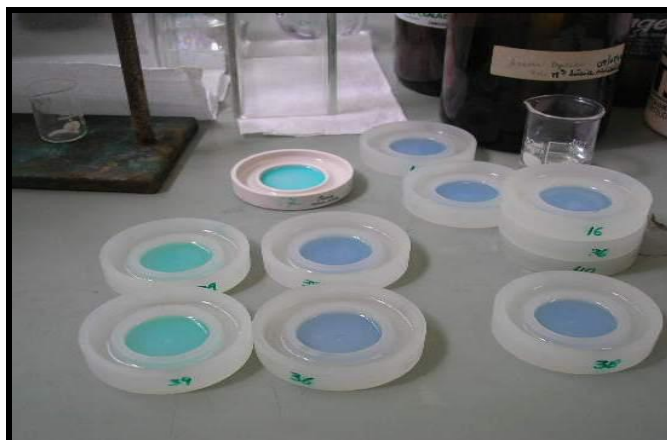
8.3 COLÔNIAS DE ENTEROBACTÉRIAS EM ÁGAR CRISTAL VIOLETA VERMELHO NEUTRO BILE GLICOSE



8.4 INCUBAÇÃO DE PLACAS COM ÁGAR BAIRD PARKER COM GEMA DE OVO E TELURITO DE POTÁSSIO PARA ISOLAMENTO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA (à esquerda) E DE PLACAS COM VRBG PARA ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS (à direita)



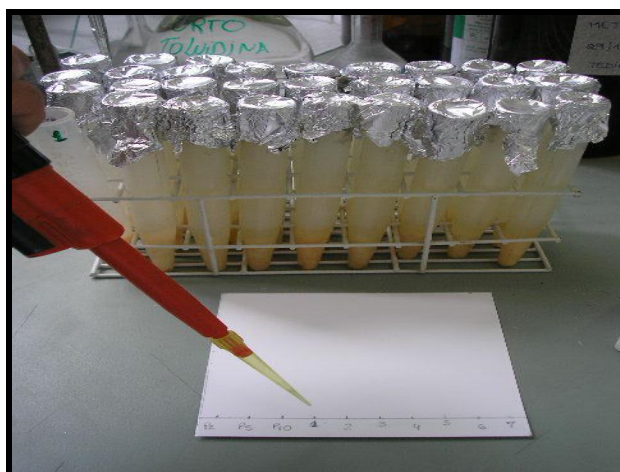
8.5 PLACAS DE BVT ANTES E APÓS A TITULAÇÃO COM ÁCIDO CLORÍDRICO



8.6 FILTRAGEM DAS AMOSTRAS DURANTE A FASE DE EXTRAÇÃO NA CLAE



8.7 TUBOS CÔNICOS COM SOLUÇÕES DAS AMOSTRAS A SEREM APLICADAS NA PLACA DE SÍLICA GEL (SIGMA®) DURANTE A CCD



8.8 TUBOS DE ENSAIO CONTENDO DESTILADO E TBA LEVADOS À FERVURA



8.9 CROMATÓGRAFO, COLUNA, DETECTOR E IMPRESSORA DE CLAE



8.10 IMPRESSÃO DE GRÁFICO MOSTRANDO PICO DE HISTAMINA

