



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ANA PATRÍCIA CAVALCANTE CARNEIRO

ESTUDO DA MICROBIOTA FORMADORA DE HISTAMINA EM CAVALA
(*Scomberomorus cavalla*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE
ÓLEOS ESSENCIAIS

FORTALEZA

2018

ANA PATRÍCIA CAVALCANTE CARNEIRO

ESTUDO DA MICROBIOTA FORMADORA DE HISTAMINA EM CAVALA
(*Scomberomorus cavalla*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C287e Carneiro, Ana Patrícia Cavalcante.

Estudo da microbiota formadora de histamina em cavala (*Scomberomorus cavalla*) e avaliação da atividade bactericida de óleos essenciais. / Ana Patrícia Cavalcante Carneiro. – 2018.
80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva.

Coorientação: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

1. Antimicrobiano natural. 2. Intoxicação. 3. Pescado. I. Título.

CDD 664

ANA PATRÍCIA CAVALCANTE CARNEIRO

ESTUDO DA MICROBIOTA FORMADORA DE HISTAMINA EM CAVALA
(*Scomberomorus cavalla*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em: 29/08/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Neuma Maria de Souza Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Francisco e Maria Helenice.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, por tudo de bom que tenho e pelo conhecimento que me permitistes adquirir.

Aos meus pais Maria Helenice Cavalcante Carneiro e Francisco Vieira Carneiro, pelo apoio, amor incondicional e a educação que sempre me deram.

Ao meu irmão Antônio Yuri Cavalcante Carneiro e aos meus familiares.

Ao meu marido Frederico Silva Thé Pontes Filho, pelo amor, apoio e paciência, que durante todos esses anos esteve presente nos momentos de tristeza e de alegria.

À minha orientadora Profa. Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva por contribuir tanto para a minha formação com os seus ensinamentos.

À minha coorientadora Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa, pela dedicação, responsabilidade, firmeza e por me aceitar e me acolher em seu grupo, acreditando e investindo em mim. Serei eternamente grata!

Aos membros da banca Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza, Profa. Dra. Francisca Gleire Rodrigues de Menezes e Dra. Neuma Maria de Souza Pinheiro pelas valiosas colaborações que certamente enriqueceram este documento e minha formação.

Ao Dr. Ernesto Hofer, à Dra. Nilma Cintra Leal e à Lílian Amorim pelas valorosas colaborações nos sequenciamentos genéticos realizados no presente estudo.

À Dra. Cristiane Teles por tudo que me ensinou, pela sua amizade, competência e acima de tudo por sua generosidade. Quem tem a Cris tem tudo!

Ao Dr. Rafael Rocha por sua grande generosidade e muita paciência em sanar todas as minhas dúvidas e pelas milhares de vezes que literalmente me salvou na “biomol”.

A todos os companheiros do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), em especial à Marina Rodriguez, Jade Abreu, Rosa Helena, Maria João, Sylvânio, Rebeca Martins, Yasmin Girão e Larissa Nunes.

À Jéssica Lucinda pelo carinho e toda atenção, sempre disposta a ajudar a mim e a todos e à Mariana Franco minha companheira nas madrugadas de coleta, em busca do “Faca à laser”! Obrigada pela amizade.

À Aline Almeida, Tayla Araújo, Jéssica Bezerra e Kamila Freitas pela amizade e sorrisos durante esse tempo de faculdade.

Ao Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará e todos os seus funcionários.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao Departamento de Engenharia de Alimentos e todos os seus funcionários, em especial ao Sr. Luiz (*in memoriam*).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, a qual contribuiu para a realização do presente trabalho.

À todos que estiveram direta ou indiretamente comigo nessa caminhada, o meu muito obrigada!

RESUMO

A histamina é um dos produtos da deterioração microbiana do pescado, pode causar intoxicação alimentar, geralmente denominada de intoxicação por escombrídeos. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias produtoras de histamina (BPH) no muco superficial da pele e nas brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*) e avaliar o uso de substâncias com propriedades bioativas (óleos essenciais) para o controle do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, da formação de histamina. Foram realizadas quatro coletas (maio a agosto de 2017), no Mercado dos Peixes (Fortaleza-CE). Foi realizada a quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e de BPH. Foram analisadas as interações entre as contagens das BHC e das BPH (total e com halo), entre as quatro coletas, através de análise de variância e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As colônias com coloração roxa e com halo no meio diferencial para BPH (resultado positivo para a produção de histamina) foram isoladas para a identificação. Os isolados foram classificados quanto as características morfotintoriais e identificados por biologia molecular. As BPH foram avaliadas qualitativamente quanto à capacidade de produzirem cadaverina e putrescina, através da descarboxilação de lisina e ornitina. Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim, cravo-da-índia (botões) e gengibre, frente à 20 cepas de BPH identificadas e selecionadas. As contagens para a superfície da pele da cavala foram de 4,52 Log UFC/cm² para BHC, 4,67 Log UFC/cm² para BPH (total) e 4,16 Log UFC/cm² para BPH (coloração roxa e halo). Para as brânquias 5,53 Log UFC/brânquia para BHC, 6,8 Log UFC/brânquia para BPH (total) e 6,2 Log UFC/brânquia para BPH (coloração roxa e halo). Foram identificados 113 isolados de BPH, 99 (87,61%) Gram negativos e 14 (12,39%) Gram positivos. Quanto a diversidade das BPH, as mais abundantes foram dos gêneros *Pseudomonas* (36%), *Vibrio* (18%), *Aeromonas* (8%), *Bacillus* (4%) e *Shewanella* (4%). Das 113 BPH identificadas, 57 (50,44%) apresentaram resultado positivo para descarboxilação de lisina e ornitina, 6 (5,32%) para lisina, 15 (13,27%) para ornitina e 35 (30,97%) não apresentaram resultado positivo. Esta pesquisa é uma contribuição ao conhecimento da diversidade de BPH em pescado marinho de águas tropicais. Foram quantificadas BHC e BPH (com resultado positivo) em quantidades equivalentes no muco superficial da pele e nas brânquias da cavala. Foi observada uma influência da época do ano no número e na diversidade das BPH, ocorrendo provavelmente pela sazonalidade do regime de chuvas no Estado do Ceará. BPH, tanto Gram negativas, quanto Gram positivas estão presentes na superfície da pele e nas brânquias da cavala, porém com predominância de bactérias Gram negativas. A maioria das BPH isoladas foi capaz de

produzir também putrescina e cadaverina. O óleo essencial de cravo foi o mais eficiente como antimicrobiano contra BPH.

Palavras-chave: Antimicrobiano natural. Intoxicação. Pescado.

ABSTRACT

Histamine is one of the products of fish microbial spoilage, can cause food poisoning, generally referred to as scombroid poisoning. The aim of this work was to isolate and identify histamine-producing bacteria (HPB) in the skin superficial mucus and gills of the mackerel (*Scomberomorus cavalla*) and to evaluate the use of substances with bioactive properties (essential oils) for the control of bacterial growth and, consequently, the formation of histamine. Four samplings (May to August of 2017) were carried out at Fish Market in Fortaleza-CE. The quantification of culturable heterotrophic bacteria (CHB) and HPB was performed. The interactions between the CHB and the HPB (total and halo) counts were analyzed among the four samplings through analysis of variance and Tukey's test ($p \leq 0.05$). The colonies with purple staining and halo in the differential medium for HPB (positive result for histamine production) were isolated for identification. The isolates were classified as morphotintorials and identified by molecular biology. The HPB were qualitatively evaluated for the ability to produce cadaverine and putrescine by decarboxylation of lysine and ornithine. The antimicrobial activity of rosemary, clove (buttons) and ginger essential oils was evaluated against the 20 identified and selected HPB strains. The counts for the mackerel skin surface were 4.52 Log CFU/cm² for CHB, 4.67 Log CFU/cm² for HPB (total) and 4.16 Log CFU/cm² for HPB (purple and halo). For gills 5.53 Log CFU/gill for CHB, 6.8 Log CFU/gill for HPB (total) and 6.2 Log CFU/gill for HPB (purple and halo). There were 113 isolates of HPB, 99 (87.61%) Gram negative and 14 (12.39%) Gram positive. As for the diversity of HPB, the most abundant were *Pseudomonas* (36%), *Vibrio* (18%), *Aeromonas* (8%), *Bacillus* (4%) and *Shewanella* (4%). Of the 113 HPB, 57 (50.44%) are positive for the decarboxylation of lysine and ornithine, 6 (5.32%) for lysine, 15 (13.27%) for ornithine and 35 (30.97%) didn't present a positive result. This research is a contribution to the knowledge of the diversity of HPB in tropical marine fish. CHB and HPB (with positive result) were quantified in equivalent amounts in the skin superficial mucus and in the gills of the mackerel. It was observed an influence of the time of year on the number and diversity of HPB, probably occurring due to the seasonality of the rainfall regime in the State of Ceará. Both HPB Gram negative and Gram positive are present on the mackerel skin surface and gills, but there is a predominance of Gram negative bacteria. Most of HPB was also able to produce putrescine and cadaverine. Clove essential oil was the most efficient as an antimicrobial against HPB.

Keywords: Natural antimicrobial. Intoxication. Fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Reação de descarboxilação do aminoácido histidina, pela ação da enzima bacteriana histidina descarboxilase (HDC)	26
Figura 2	– Prováveis locais e mecanismos de ação dos componentes dos óleos essenciais na célula bacteriana	32
Figura 3	– Obtenção do muco superficial da pele da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>) através de esfregação com swab	37
Figura 4	– Esfregação com swab na superfície das brânquias	38
Figura 5	– Fluxograma do processamento das amostras	39
Figura 6	– Colônias com coloração roxa e com halo em meio diferencial para bactérias produtoras de histamina	40
Figura 7	– Tubos de ensaio com os isolados bacterianos produtores de histamina, com resultado positivo para a produção de histamina em meio diferencial	42
Figura 8	– Fluxograma da técnica de Coloração de Gram	43
Figura 9	– Fluxograma do Teste de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina ...	46
Figura 10	– Resultado da análise de concentração inibitória mínima para <i>Acinetobacter gyllenbergii</i> (cepa 302)	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do Mix de reagentes e condições de termociclagem utilizados na reações de amplificação	44
Tabela 2 – Contagem Padrão em Placas (CPP) em Log UFC/cm ² de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e de Bactérias Produtoras de Histamina (BPH) do muco superficial da pele da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	48
Tabela 3 – Contagem Padrão em Placas (CPP) em Log UFC/brânquia de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e de Bactérias Produtoras de Histamina (BPH) das brânquias da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	50
Tabela 4 – Resultado da atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo frente às BPH selecionadas	62
Tabela 5 – Resultado da atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre frente às BPH selecionadas	63
Tabela 6 – Resultado da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim frente às BPH selecionadas	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantificação das BHC e das BPH no muco superficial da pele da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	49
Gráfico 2 – Quantificação de BHC e de BPH das brânquias da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>) durante o período de maio a agosto de 2017	51
Gráfico 3 – Quantificação das BHC e das BPH das brânquias da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	52
Gráfico 4 – Diversidade total (%) das bactérias produtoras de histamina identificadas ..	54
Gráfico 5 – Diversidade de bactérias produtoras de histamina isoladas da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>), durante o período de maio a agosto de 2017	56
Gráfico 6 – Diversidade de bactérias produtoras de histamina isoladas do muco superficial da pele e das brânquias da cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	58
Gráfico 7 – Capacidade de descarboxilação de lisina e ornitina pelos isolados produtores de histamina	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Produção e consumo de pescado no Brasil e no Nordeste	18
2.2	Cavala (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	19
2.3	Aminas bioativas	20
2.3.1	<i>Aminas biogênicas em alimentos</i>	21
2.4	Intoxicação alimentar por histamina	22
2.4.1	<i>Formação de histamina em peixes</i>	25
2.4.2	<i>Medidas de controle da formação de histamina</i>	28
2.5	Biologia molecular na identificação de bactérias	29
2.6	Óleos essenciais	31
2.6.1	<i>Óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)</i>	33
2.6.2	<i>Óleo essencial de cravo (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)</i>	34
2.6.3	<i>Óleo essencial de gengibre (<i>Zingiber officinale</i> Roscoe)</i>	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Material	37
3.2	Processamento das amostras	37
3.3	Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis e de bactérias produtoras de histamina	40
3.3.1	<i>Análises estatísticas</i>	41
3.4	Isolamento e identificação das cepas bacterianas produtoras de histamina	41
3.4.1	<i>Isolamento</i>	41
3.4.2	<i>Classificação morfotintorial das bactérias produtoras de histamina isoladas</i>	42
3.4.3	<i>Identificação das bactérias produtoras de histamina</i>	43
3.4.3.1	<i>Extração do DNA total</i>	43
3.4.3.2	<i>Amplificação do DNA (região 16S DNAr) e sequenciamento</i>	44
3.5	Avaliação da produção de outras aminas biogênicas	45
3.6	Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente às bactérias produtoras de histamina	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis e de bactérias	48

	produtoras de histamina do muco superficial da pele e das brânquias	
4.2	Isolamento e identificação das bactérias produtoras e histamina	53
4.2.1	<i>Identificação genotípica</i>	53
4.3	Produção de outras aminas biogênicas	59
4.4	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente às bactérias produtoras de histamina selecionadas	61
5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE A – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS CONTAGENS DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS CULTIVÁVEIS (BHC) E BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA (BPH) DURANTE O PERÍODO DE COLETAS	77
	APÊNDICE B – IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS PRODUTORAS DE HISTAMINA ISOLADAS DO MUCO SUPERFICIAL DA PELE E DAS BRÂNQUIAS DA CAVALA (<i>Scomberomorus cavalla</i>)	78

1 INTRODUÇÃO

O pescado é considerado um dos alimentos mais completos, constituindo uma fonte rica em proteínas de alto valor biológico, vitaminas A, D, E e do complexo B e minerais, dentre os quais cálcio, fósforo, ferro e, no caso dos peixes de água salgada, iodo. Além disso, possui a fração lipídica rica em ácidos graxos insaturados, como o ômega 3, propostos como nutrientes essenciais, responsáveis por efeitos cardioprotetores, possuindo, ainda, baixa concentração de colesterol (ARAÚJO, 2013; SARTORI; AMANCIO, 2012; SILVA, 2008).

Por conta da qualidade nutricional do pescado e da divulgação de estudos que o associam com melhorias para a saúde, tem aumentado, significativamente, o interesse por esse alimento (SARTORI; AMANCIO, 2012). A média do consumo mundial, entre os anos de 2013 e 2015, foi de 20,2 kg *per capita*⁻¹ ano⁻¹ e, segundo estimativas da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), em 2025, a média do consumo mundial chegará a 21,8 kg *per capita*⁻¹ ano⁻¹ (FAO, 2016).

No entanto, apesar de todas as características benéficas sob o aspecto nutricional, o pescado é altamente susceptível à deterioração, sendo um alimento altamente perecível devido à sua própria constituição, com pH próximo à neutralidade, elevada atividade de água nos tecidos e elevado teor de nutrientes facilmente utilizáveis por microrganismos. Além disso, o peixe apresenta, desde a captura, uma microbiota natural com grande potencial de degradação (ASHIE; SMITH; SIMPSON, 1996; OGAWA; MAIA, 1999).

Um dos produtos da deterioração microbiana do pescado é a histamina, uma amina biogênica, heterocíclica, não volátil e termoestável. A histamina é formada através da descarboxilação, pela enzima bacteriana histidina-descarboxilase, que converte o aminoácido L-histidina em histamina, durante a fase de *post mortem* do pescado. A formação de histamina é favorecida pela presença de uma microbiota descarboxilase positiva, naturalmente presente no peixe vivo, associada com condições de manuseio e estocagem inadequadas (CARMO *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015).

A histamina possui potencial alergênico, podendo causar intoxicação alimentar ao ser humano, a qual é geralmente denominada de intoxicação por escombrídeos, por estar historicamente associada à intoxicação após o consumo de peixes da família Scombridae, como cavala, atum e bonito, os quais são, particularmente, susceptíveis à formação de histamina como resultado de contaminação bacteriana, por conterem altos níveis de histidina livre em seu músculo (BRINK *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2015).

Vários surtos de intoxicação histamínica, relacionados ao consumo de peixes escombrídeos já foram registrados, sendo o maior no Japão, em 1973, com 2656 casos, devido ao consumo de carapau (família Scombridae) desidratado. A intoxicação histamínica é ainda uma das mais prevalentes intoxicações originadas pela ingestão de alimentos marinhos nos Estados Unidos, onde de 1998 a 2007, foram notificados 321 surtos envolvendo 1.328 casos com 58 internações, de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER; GREEN, 2010; KIM *et al.*, 2003; LEHANE; OLLEY, 2000; SINGH *et al.*, 2012).

A refrigeração e o congelamento são considerados os melhores métodos para controlar a formação de histamina e outras aminas biogênicas, em pescados, através da inibição do crescimento microbiano. Porém, algumas bactérias podem crescer a baixa temperatura e produzir níveis elevados de histamina, como por exemplo, *Photobacterium phosphoreum* e ainda, *Morganella psychrotolerans*, uma bactéria capaz de produzir concentrações tóxicas de histamina entre 0 e 5 °C (EMBORG; DALGAARD; AHRENS, 2006; KANKI *et al.*, 2004; LEHANE; OLLEY, 2000; NAILA *et al.*, 2010).

Por isso, de acordo com a FAO/WHO (2013), são necessários estudos, a fim de determinar a diversidade e o papel da microbiota na produção de aminas biogênicas em peixes, assim como o efeito das diferentes populações da microbiota e a relação quantitativa entre os seus níveis de produção de amina biogênica, para que se possa desenvolver novas técnicas e medidas preventivas para o controle da formação de histamina, principalmente em espécies de peixes mais susceptíveis (BJORNSDOTTIR-BUTLER *et al.*, 2015; HU; HUANG; CHEN, 2014).

Assim, outros métodos para controlar o crescimento de bactérias produtoras de aminas biogênicas, além do controle de tempo e temperatura, têm sido considerados e analisados (NAILA *et al.*, 2010).

Os aditivos alimentares com ação antimicrobiana podem ser eficientes na redução da formação de aminas biogênicas, por inibição do crescimento bacteriano, sendo o uso de aditivos antimicrobianos de origem natural, uma alternativa eficaz, econômica e que atende aos anseios dos consumidores por alimentos naturais e livres de aditivos sintéticos (NAILA *et al.*, 2010; SANTOS, 2010).

Os óleos essenciais extraídos de vegetais são fontes de compostos antimicrobianos, por conta disso, alguns autores têm estudado a atividade antimicrobiana dos condimentos e/ou especiarias, assim como de seus óleos essenciais. Extratos etanólicos de alho apresentaram atividade antimicrobiana e inibiram a formação de aminas biogênicas

contra cepas do gênero *Bacillus* (MAH; KIM; HWANG, 2009). Óleos essenciais de canela, cravo, gengibre e anis inibiram a acumulação de amins biogênicas e o crescimento de Enterobactérias (LU *et al.*, 2015). Já o eugenol, um composto do cravo-da-índia apresentou atividade antibacteriana contra *Morganella morganii* (LOMARAT *et al.*, 2013). Desta forma, verifica-se que as substâncias inibitórias específicas de ocorrência natural em especiarias possuem potencial para inibir a formação de amins biogênicas (NAILA *et al.*, 2010; MENDONÇA, 2004; SANTOS, 2010).

Portanto, o uso de compostos antimicrobianos naturais, como nova tecnologia, pode apresentar-se como uma alternativa eficiente para garantir a qualidade e segurança em espécies de peixes susceptíveis à formação de histamina, como a cavala (*Scomberomorus cavalla*), uma espécie de peixe, pertencente à família Scombridae, que apresenta carne vermelha e um sabor bastante acentuado, devido à presença de histidina, e que é considerada uma das espécies de peixes mais apreciadas pela população da região Nordeste do Brasil, possuindo importante valor econômico na região (LESSA, 2006).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar bactérias produtoras de histamina no muco superficial da pele e nas brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*) e avaliar o uso de substâncias com propriedades bioativas (óleos essenciais), para o controle do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, da formação de histamina. Como objetivos específicos, foram considerados: (1) analisar quantitativamente bactérias heterotróficas cultiváveis e bactérias produtoras de histamina presentes no muco superficial da pele e das brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*); (2) isolar e identificar as bactérias produtoras de histamina isoladas do muco superficial da pele e das brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*); (3) avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de alecrim, cravo-da-índia (botões) e gengibre, frente às bactérias produtoras de histamina identificadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção e consumo de pescado no Brasil e no Nordeste

O Brasil apresenta um grande potencial e vantagens naturais para a produção pesqueira, pois conta com, aproximadamente, 5,5 milhões de hectares de reservatórios de água doce e uma costa litorânea de 8,4 mil quilômetros, com uma grande variedade de ambientes costeiros entre estuários, baías, manguezais, lagoas, rios, lagunas e enseadas. Além disso, o país possui clima extremamente favorável para o crescimento de organismos aquáticos, com potencial para cultivo de peixes, moluscos, crustáceos, algas, anfíbios e répteis, além da grande variedade de espécies nativas (POTENCIAL BRASILEIRO, 2014).

A produção brasileira de pescados atingiu em 2011 a quantidade de 1.431.974,40 toneladas, sendo a pesca extrativa marinha a principal fonte de produção de pescado nacional. A pesca extrativa de organismos marinhos respondeu por 553.670,00 toneladas (38,7% do total de pescado), seguida pela aquicultura continental (544.490,00 toneladas; 38,0%), pesca extrativa continental (249.600,20 toneladas; 17,4%) e aquicultura marinha (84.214,30 toneladas; aproximadamente 6%) (BRASIL, 2011).

Segundo dados da agência americana *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), o Brasil ocupa a 11ª posição no ranking mundial de produção extrativa de pescado de águas interiores, produzindo 235.527,00 toneladas, em 2014 (FAO, 2016).

A região Nordeste é responsável pela maior produção de pescado do país, com 454.216,90 toneladas, correspondendo a 31,7% da produção nacional em 2011, sendo também a responsável pela maior produção nacional da pesca extrativa marinha, com 186.012,00 toneladas (BRASIL, 2011).

O Estado do Ceará, por sua vez, tem a pesca como uma das suas principais atividades econômicas, produzindo 98.256,80 toneladas de pescado, em 2011, sendo 21.788,00 toneladas provenientes da pesca extrativa marinha, 11.307,10 toneladas da pesca extrativa continental e 65.161,70 toneladas da aquicultura (BRASIL, 2011). Segundo Carneiro e Salles (2011), os principais produtos da pesca extrativa marinha cearense são a serra (*Scomberomorus brasiliensis*) e a cavala (*Scomberomorus cavalla*), cuja participação relativa em número de indivíduos é de 68% e 20%, respectivamente.

Quanto ao consumo *per capita*, no território brasileiro, foi de 9,6 kg ano⁻¹ entre os anos de 2013 a 2015. Porém, mesmo com as políticas e campanhas para incentivar o consumo de pescado pela população brasileira, esse valor ainda está abaixo do mínimo de consumo

recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que é de, pelo menos, 12 kg *per capita*⁻¹ ano⁻¹. Contudo, a FAO estima que em 2025 o consumo *per capita* brasileiro será de 12,7 kg ano⁻¹, o que corresponderá a um aumento de 32,29% (FAO, 2016; ISAAC; ALMEIDA, 2011; MACHADO, 2015; WHO, 2007).

2.2 Cavala (*Scomberomorus cavalla*)

A família Scombridae abrange cerca de 50 espécies de peixes marinhos pelágicos, com distribuição mundial. O gênero *Scomberomorus* pertence a esta família e inclui o peixe conhecido como cavala (*Scomberomorus cavalla*), recurso abundante em toda a costa brasileira (FONTELES FILHO, 2000).

A cavala é uma espécie de peixe de hábito pelágico e migratório, de corpo alongado, robusto e fusiforme, com coloração azul-metálica escurecida no dorso e com o ventre prateado. Possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o golfo do Maine nos Estados Unidos, por todo o golfo do México, nos estados do Nordeste brasileiro, como Piauí, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia e Ceará, até o Rio de Janeiro na região Sudeste do Brasil (FONTELES FILHO, 2000; KLEIN, 1973; LESSA, 2006).

De acordo com dados da produção mundial, em 2014 foram capturadas aproximadamente 919.644,00 toneladas de *Scomberomorus* spp (FAO, 2016). No Brasil, em 2011 foram produzidos através da pesca extrativa 4.531,10 toneladas de cavala (BRASIL, 2011).

A espécie é capturada durante o ano inteiro em regiões do Nordeste do Brasil, sendo nos Estados do Ceará e Bahia registrados importantes volumes e onde ocorrem as capturas mais significativas da região Nordeste (LESSA *et al.*, 2004).

No Estado do Ceará, a cavala se distribui ao longo de toda a plataforma continental, se concentrando principalmente na porção externa e é considerada uma das espécies mais importantes do ponto de vista econômico, sendo um dos peixes mais adquiridos pela população de Fortaleza-CE, tendo grande valor comercial (FONTELES FILHO, 2000; KLEIN, 1973; LESSA, 2006).

A cavala é uma espécie ovulípara, portanto tem fecundação e desenvolvimento embrionário externos e a dieta alimentar é fundamentalmente onívora, tendo como alimentos essenciais peixes de diversas espécies, como alimentos secundários os crustáceos e moluscos, e como alimentos ocasionais, celenterados e vegetais superiores e inferiores (FONTELES FILHO, 2000).

A cavala é considerada um peixe gordo, cuja gordura total apresenta-se distribuída por todo corpo, principalmente na carne e na pele. Araújo (2013), ao avaliar peixes da região amazônica, encontrou, nos lotes de cavala analisados, conteúdo lipídico entre $0,56 \pm 0,005$ g 100g^{-1} e $2,81 \pm 0,08$ g 100g^{-1} . Já em estudo realizado por Menezes *et al.* (2009), foram encontrados valores de $2,5 \pm 0$ g 100g^{-1} de lipídeos para *Scomberomorus cavalla* oriunda da costa marítima de Alagoas, Brasil.

O conteúdo lipídico dessa espécie pode variar ao longo do ano, devido ao seu crescimento e ciclo de maturação, acompanhado de períodos com oferta e escassez de alimentos, podendo variar também de acordo com o tipo de músculo corporal, sexo, idade, época do ano e habitat (ARAÚJO, 2013; CAPONIO *et al.*, 2004).

O músculo desta espécie consiste, ainda, em uma excelente fonte de aminoácidos e proteínas de fácil digestibilidade, além de possuir uma composição rica em lipídios insaturados, fornecendo à dieta maior conteúdo de ácidos graxos denominados "essenciais", os quais o organismo necessita para o seu correto funcionamento, porém os humanos e os demais mamíferos são incapazes de sintetizarem, como por exemplo, o ômega-3 (ARAÚJO, 2013; MENEZES *et al.*, 2009).

Os ácidos eicosapentaenoicos (EPA), docosaexaenoico (DHA) e o alfa-linolênico são considerados os ácidos graxos ômega-3 mais importantes para a dieta humana (SARTORI; AMANCIO, 2012), estando relacionados com a redução dos triglicerídeos séricos e prevenção de infartos. De acordo com Leaf (2006), a *American Heart Association* recomenda que todas as pessoas devem consumir por semana pelo menos duas refeições de peixe gordo, como salmão e cavala.

Com relação ao perfil de ácidos graxos presentes na cavala, Menezes *et al.* (2009) encontraram ao analisar filés, teores de 17,34% de ácido palmítico, 10,45% de ácido esteárico, 7,74% de ácido oleico (C18:1 n-9), 6,91% de ácido linoleico (C18:2 n-6) e 2,90% de alfa-linolênico (C18:3 n-3). No mesmo estudo, o somatório de ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) e docosaexaenoico (DHA; 22:6 n-3) para a cavala foi de 15,32%.

2.3 Aminas bioativas

As aminas bioativas ou biologicamente ativas são compostos nitrogenados, de baixo peso molecular, em que um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia (NH_4) foram substituídos por grupos alquila ou arila. Podem também ser definidas como bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas, que são formadas por processos bioquímicos e

participam de funções metabólicas e fisiológicas importantes nos organismos vivos (BRINK *et al.*, 1990; CINQUINA *et al.*, 2004; GLÓRIA, 2005; HALÁSZ *et al.*, 1994; KIM; MAH; HWANG, 2009; SHALABY, 1996; ZOTOU *et al.*, 2003).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química, da função que exercem e da via biossintética (GLÓRIA, 2005).

Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, podem ser classificadas em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (GLÓRIA, 2005).

Com relação à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina) (BARDÓCZ, 1995; SILLASANTOS, 1996; SMITH, 1980-81).

Já com relação à função que exercem, as aminas bioativas podem ser classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento, por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular, ou em vasoativas e neuroativas devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDÓCZ *et al.*, 1993).

Quanto à via biossintética, as aminas podem ser classificadas em naturais ou biogênicas. As aminas naturais são formadas nas células durante a biossíntese “in situ”, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar armazenadas nos mastócitos e basófilos, como a histamina. Já as aminas biogênicas podem ser formadas através dos processos de aminação e transaminação de aldeídos ou cetonas, por hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos, sendo a última a principal via de formação, principalmente em alimentos, por ação de descarboxilases bacterianas (histamina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (BARDÓCZ, 1995; BRINK *et al.*, 1990; GLÓRIA, 2005; MAINTZ; NOVAK, 2007; SHALABY, 1996).

2.3.1 Aminas biogênicas em alimentos

A formação de aminas biogênicas, tanto o tipo como a quantidade, dependem da natureza do alimento (disponibilidade de aminoácidos livres), da presença de microrganismos descarboxilase positivos, que podem ser parte da microbiota de associação do alimento ou podem ser introduzidos por contaminação antes, durante ou após o processamento do

alimento, como também das condições favoráveis para o crescimento bacteriano, síntese e ação das enzimas descarboxilases (BRINK *et al.*, 1990; SHALABY, 1996).

As aminas biogênicas são, em geral, denominadas em função dos aminoácidos que as originam, sendo as principais: histamina, tiramina, putrescina, cadaverina e triptamina, sintetizadas pela descarboxilação dos aminoácidos histidina, tirosina, ornitina, lisina e triptofano, respectivamente (BRINK *et al.*, 1990; GLÓRIA, 2005).

As ingestões normais de aminas biogênicas são metabolizadas no trato intestinal por conjugação, ou mediante reações de oxidação baseada nas atividades das enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO) (SMITH, 1980-81). Assim, as aminas geralmente não apresentam risco à saúde humana. Entretanto, pode ocorrer intoxicação alimentar quando são ingeridas elevadas concentrações de aminas, saturando, assim, o sistema de desintoxicação, ou quando o sistema natural de degradação das aminas é inibido ou geneticamente deficiente (BRINK *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994; KIM; MAH; HWANG, 2009).

A determinação do limiar de toxicidade exata de aminas biogênicas é, portanto, extremamente difícil, pois a dose tóxica é fortemente dependente da eficiência dos mecanismos de degradação da amina, que pode variar consideravelmente entre indivíduos diferentes, do uso de certos medicamentos (agentes farmacológicos inibidores da MAO) que diminuem a eficiência do sistema de desintoxicação, e também do consumo de bebidas alcoólicas, que resulta em uma sensibilidade aumentada para as aminas biogênicas, pois o etanol também pode atuar como inibidor da MAO. Por isso, o uso de álcool e medicamentos deve ser levado em consideração ao avaliar os níveis tóxicos em certos alimentos (BRINK *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994).

As intoxicações alimentares mais notórias causadas por aminas biogênicas estão relacionadas à histamina, que ocorre em graus variáveis em muitos alimentos, especialmente aqueles ricos em histidina, sendo um composto de perigo potencial e relacionado historicamente como o principal agente causador de intoxicação por peixes escombrídeos (BRINK *et al.*, 1990).

2.4 Intoxicação alimentar por histamina

A intoxicação histamínica, também denominada de intoxicação por escombrídeos, está frequentemente associada à intoxicação após o consumo de peixes da família Scombridae, como atum e cavala, os quais são particularmente susceptíveis à formação de

histamina como resultado de ação bacteriana, por conterem grandes quantidades de histidina livre em seus tecidos. É um tipo de intoxicação alimentar com sintomas e tratamento similares aqueles associados com as alergias alimentares (BRINK *et al.*, 1990; HUNGERFORD, 2010; SILVA, 2008).

A intensificação do perigo de intoxicação por histamina é decorrente ainda das características de não volatilidade e da estabilidade ao calor da molécula de histamina. Esta pode tornar o produto tóxico mesmo antes de serem percebidas alterações, como deterioração do produto ou características sensoriais inaceitáveis (ASHIE; SMITH; SIMPSON, 1996; BRINK *et al.*, 1990).

Com isso, a fim de garantir a qualidade do pescado e a segurança do consumidor, alguns países têm estabelecido limites ou níveis máximos aceitáveis para histamina em pescado. A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA), preconiza um nível máximo de 50 mg kg⁻¹ de histamina para peixes escombrídeos, enquanto as legislações do Brasil e Mercosul estabelecem o limite máximo de histamina em peixes de 100 mg kg⁻¹. Já a União Europeia, exige o limite de 100 a 200 mg kg⁻¹ de histamina e uma amostragem de nove peixes por lote (BRASIL, 1997; CE, 1991; FDA, 1995; VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997).

Os sintomas e os efeitos tóxicos da intoxicação por histamina, que são semelhantes a uma alergia alimentar comum, são variáveis e incluem urticária, erupções cutâneas, rubor, inchaço facial, dificuldade de deglutição, sede, cefaleia, vertigem, dormência oral, aumento da frequência cardíaca e queda da pressão arterial. Até sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia. O edema de glote pode ocorrer como uma consequência mais grave (GILBERT *et al.*, 1980; MAINTZ; NOVAK, 2007; SHALABY, 1996).

Porém, a intoxicação por histamina pode ser distinguida da alergia alimentar com base na falta de história prévia de reações alérgicas do indivíduo ao alimento incriminado, elevada taxa de ataque em surtos de grupo e na presença de níveis elevados de histamina no alimento incriminado (BRINK *et al.*, 1990).

A histamina pode ser degradada em seres humanos por diferentes reações, porém as duas principais rotas são a oxidação a imidazol-acetaldeído, pela enzima diamina oxidase (DAO) e a metilação a 1,4-metil-histamina, pela enzima histamina N-metiltransferase (HMT). Esses metabólitos têm pouca ou nenhuma atividade e são excretados na urina (GLÓRIA, 2005; HUNGERFORD, 2010).

Porém, o sistema de degradação da histamina pode ser inibido pela administração oral simultânea de outras aminas, potencializando a intoxicação alimentar causada pela histamina. A putrescina e a cadaverina, que possuem uma atividade toxicológica muito mais baixa do que a histamina, podem potencializar o efeito tóxico da histamina, por inibir as enzimas DAO e assim impedirem a desintoxicação da histamina. Outras aminas que podem atuar como potencializadoras são a tiramina (que pode inibir MAO), a triptamina (que inibe DAO) e a feniletilamina (inibidora DAO e HMT) (BRINK *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994; SILLA-SANTOS, 1996; TAYLOR, 1985).

Com isso, de acordo com alguns autores, a presença dessas substâncias potencializadoras, pode explicar porque, em alguns casos, peixes deteriorados são mais tóxicos que a mesma quantidade de histamina quando ingerida sozinha. Além disso, a indicação de que pode haver múltiplas toxinas, talvez agindo sinergicamente, pode explicar a variabilidade clínica encontrada. Consequentemente, a existência de potencializadores pode influenciar, drasticamente, a dose limiar tóxica para histamina em alimentos (LEHANE; OLLEY, 2000; SHALABY, 1996).

Sendo assim, o efeito toxicológico e a gravidade dos sintomas dependem da quantidade de histamina ingerida, susceptibilidade do indivíduo, presença de outras aminas e da fisiologia intestinal do indivíduo (LEE *et al.*, 2015; SILLA-SANTOS, 1996).

O maior surto de intoxicação histamínica foi registrado no Japão, em 1973, com 2656 casos, causados pelo consumo de carapau (família Scombridae) desidratado. Desde então, a rede mundial para a pesca, processamento e distribuição de peixes e seus produtos reconheceu o envenenamento por histamina como um problema global (LEHANE; OLLEY, 2000; SINGH *et al.*, 2012).

A intoxicação histamínica é ainda, uma das mais prevalentes intoxicações originadas pela ingestão de alimentos marinhos nos Estados Unidos, onde entre os anos de 1979 e 1980 mais de 200 pessoas ficaram doentes depois de consumir dourado congelado importado. Outros incidentes relacionados a anchovas enlatadas e cavala fresca e congelada, pescado azul e vôngoles também foram reportados (KIM *et al.*, 2003).

Segundo Björnsdóttir-Butler e Green (2010), nos Estados Unidos, este tipo de intoxicação representou 7,5% de todos os surtos de origem alimentar e 38% de todas as doenças relacionadas com marisco, relatadas entre 1990 e 2003. De 1998 a 2007, foram notificados 321 surtos envolvendo 1.328 casos com 58 internações e nenhuma morte de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention*.

Porém, embora a intoxicação histamínica ocorra em todo o mundo e seja a forma mais comum de intoxicação causada pela ingestão de peixe, não existem estatísticas reais a respeito destes incidentes, uma vez que os dados disponíveis são escassos e possivelmente não retratam a prevalência real. Muitos casos de intoxicação histamínica não são reportados, porque muitas vezes a doença se manifesta de forma efêmera, com sintomas que podem ser relativamente leves, passageiros e as pessoas acometidas acabam não procurando ajuda médica. Além disso, o desconhecimento dos médicos sobre a intoxicação histamínica leva a diagnósticos errados. E ainda, mesmo quando o diagnóstico é feito corretamente, muitos países não mantêm um registro oficial dos surtos e não possuem sistemas adequados para armazenar as informações destes casos. Desta forma, a real ocorrência de intoxicação histamínica não é conhecida (GLÓRIA, 2005; LEHANE; OLLEY, 2000).

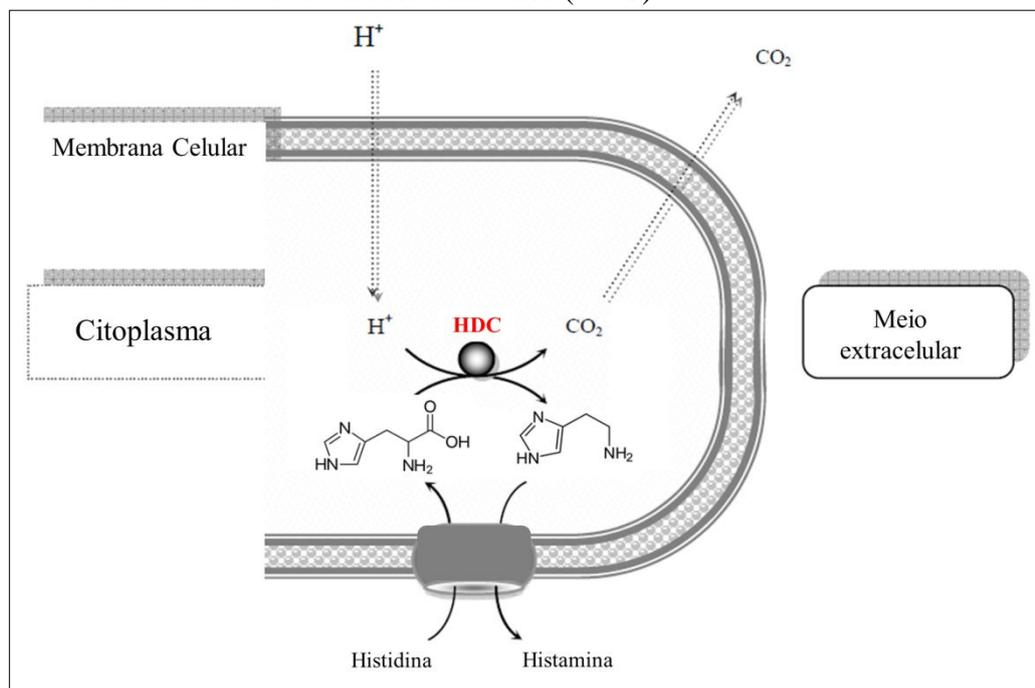
No Brasil, não existem dados oficiais sobre a ocorrência de casos de intoxicação por histamina. Porém, na literatura, podem ser encontrados alguns poucos relatos de surtos de intoxicação por escombrídeos. Segundo Evangelista (2010), em estudo sobre a ocorrência de histamina em escombrídeos, foram relatados três surtos de intoxicação por escombrídeos na região Nordeste do Brasil, comunicados à Vigilância Sanitária de Natal (Rio Grande do Norte), envolvendo atuns e acometendo um total de 25 pessoas.

2.4.1 Formação de histamina em peixes

O peixe fresco, imediatamente após a captura, é praticamente livre de histamina, porém, ao longo do tempo e dependendo da espécie de peixe, das condições da captura, temperatura e condições gerais de armazenamento (atmosfera, atividade de água e contaminação microbiana cruzada), os níveis de histamina aumentam como resultado do metabolismo bacteriano (ARAÚJO, 2013; BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER; GREEN, 2010).

A histamina [4-(2-aminoetil)imidazol], uma diamina primária e heterocíclica é produzida em peixes por conversão enzimática bacteriana, através da ação da enzima histidina descarboxilase (HDC), produzida por certos microrganismos, que convertem o aminoácido histidina à histamina (FIGURA 1). Existem duas classes de enzimas HDC, sendo uma classe encontrada em células eucarióticas e bactérias Gram-negativas e a outra encontrada em bactérias Gram-positivas. Ambas as classes possuem coenzimas associadas diferentes (BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER; GREEN, 2010; FAO/WHO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Figura 1 – Reação de descarboxilação do aminoácido histidina, pela ação da enzima bacteriana histidina descarboxilase (HDC).



Fonte: Adaptada de European Food Safety Authority – EFSA (2011).

De acordo com Björnsdóttir-Butler e Green (2010), as bactérias produtoras de histamina Gram-positivas são mais frequentemente associadas aos produtos fermentados como salame, queijo, chucrute e vinho, enquanto as bactérias Gram-negativas são mais comuns em peixes e seus produtos.

Em peixes, as bactérias produtoras de histamina (BPH) podem ser parte da microbiota natural, a qual é influenciada pelo tipo de habitat aquático, localização geográfica, estação do ano, temperatura do oceano e o hábito alimentar dos peixes, sendo mais comumente presentes na pele, guelras, ou no trato gastrointestinal dos peixes. As BPH também podem ser introduzidas por contaminação cruzada durante processamento, por manipulação ou por contato com superfícies contaminadas (BJORNSDOTTIR-BUTLER *et al.*, 2011; FAO/WHO, 2013; SINGH *et al.*, 2012; TAYLOR, 1985).

Assim, a quantidade de histamina produzida depende tanto do nível de histidina livre presente, que está relacionado com a espécie de peixe, como também da quantidade e atividade da enzima HDC, produzida por certas bactérias, que tem relação direta com a carga microbiana e velocidade de multiplicação desses microrganismos. Sendo assim, a produção de HDC depende das condições que favoreçam o desenvolvimento das bactérias produtoras (FAO/WHO, 2013; SINGH *et al.*, 2012; TAYLOR, 1985).

Na literatura científica inúmeras bactérias, naturais ou contaminantes, foram descritas como possuindo atividade de HDC, portanto, produtoras de histamina. A maioria são bactérias Gram-negativas e do ambiente marinho, como *Photobacterium damsela* e *P. phosphoreum*, *Pseudomonas putrefaciens*, *P. putida* e *P. fluorescens*, *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas hydrophila* (BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER; GREEN, 2010; EFSA, 2011; KANKI *et al.*, 2004; VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997; VIEIRA, 2010).

As maiores representantes de BPH são as bactérias dos gêneros *Clostridium* (*Clostridium perfringens*), *Lactobacillus* e os membros da família Enterobacteriaceae (como *Enterobacter cloacae* e *E. aerogenes*, *Morganella morganii* e *M. psychrotolerans*, *Raoultella planticola*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* e *P. vulgaris*) (EFSA, 2011; EMBORG; DALGAARD; AHRENS, 2006; GLÓRIA, 2005; TAYLOR *et al.*, 1978; VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997; VIEIRA, 2010).

Entre as enterobactérias, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* e *Klebsiella pneumoniae* (bacilos Gram-negativos) são apontadas como as principais bactérias produtoras de histamina, sendo frequentemente isoladas de peixes associados à intoxicação histamínica (VECIANA-NOGUÉS; MARINÉ-FONT; VIDAL-CAROU, 1997; FAO/WHO, 2013).

Kim *et al.* (2003), em estudo sobre a presença de *Morganella morganii* em peixes frescos, encontraram *M. morganii* em todos os tecidos de 15 cavalas analisadas, sendo mais frequentemente detectada nas brânquias seguida da superfície. Já Vieira (2010), em seus estudos com cavala, identificou que as possíveis bactérias formadoras de histamina nesse tipo de peixe seriam: *Citrobacter freundii* (índice de identificação de 99,4%), *Aeromonas hydrophila* (índice de identificação de 96,4%) e *Escherichia vulneris* (índice de identificação de 82,2%).

Kim, Mah e Hwang (2009), em investigação sobre as espécies microbianas responsáveis pela formação de amins biogênicas em peixes, observaram que a espécie *Enterobacter* spp. era responsável não só pela produção de histamina, mas também pela produção de putrescina e cadaverina em pescado.

Contudo, a maioria dos estudos referentes à ocorrência de histamina em pescado se restringe a espécies do ambiente marinho de regiões temperadas ou de clima frio (SILVEIRA, 2002). Existem poucas informações sobre a diversidade de BPH em animais aquáticos de ambientes tropicais e subtropicais. É importante o conhecimento sobre essa

microbiota e o potencial risco de produção de histamina em alimentos, assim como métodos de prevenção (FERRARIO *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2013).

2.4.2 Medidas de controle da formação de histamina

Uma vez que a histamina é formada por bactérias, a formação desta pode ser controlada através da inibição do crescimento de BPH, minimizando a produção de enzimas e consequentemente de histamina (FAO/WHO, 2013; NAILA *et al.*, 2010; SHALABY, 1996; SILLA-SANTOS, 1996).

Muitas condições podem afetar o crescimento dos microrganismos produtores de histamina, na qual a temperatura é a principal determinante. Por conta disso, a refrigeração e o congelamento são apontados como os melhores métodos para controlar o crescimento das bactérias que produzem a histamina e outras aminas biogênicas. No entanto, a refrigeração sozinha não impede a formação de histamina e outras aminas biogênicas, pois algumas BPH são psicrotróficas, podendo crescer a baixa temperatura e produzir níveis elevados de histamina (EMBORG; DALGAARD; AHRENS, 2006; LEHANE; OLLEY, 2000; NAILA *et al.*, 2010).

Segundo Torido *et al.* (2014), uma grande variedade de espécies de peixes está contaminada com BPH, tanto mesofílicas, como psicrófilas, ambos os grupos com elevada capacidade de produção de histamina, embora apenas as BPH mesofílicas tenham sido destaque de muitos estudos.

Emborg, Dalgaard e Ahrens (2006) identificaram *Morganella psychrotolerans*, uma bactéria formadora de histamina, como uma bactéria psicrotolerante, capaz de produzir concentrações tóxicas de histamina em temperaturas de 0 a 5 °C. Kanki *et al.* (2004), em estudo com *Photobacterium phosphoreum*, revelaram que essa bactéria, se adapta a baixas temperaturas, podendo ser responsável pela produção de histamina em peixes sob condições de refrigeração. Além disso, sabe-se que a manutenção da cadeia de frio durante as etapas de transporte marítimo e terrestre é uma tarefa árdua e falhas eventuais nesta cadeia podem propiciar o crescimento de microrganismos e a elevação nos teores de histamina (ARAÚJO, 2013; GLÓRIA *et al.*, 1999).

O gelo utilizado com a finalidade de preservar o pescado pode ser fonte de contaminação por BPH. De acordo com Economou *et al.* (2016), o gelo pode ser um veículo de contaminação de peixes, uma vez que foram encontrados até 4,46 Log UFC mL⁻¹ de BPH em gelo utilizado na refrigeração de pescado. Portanto, é necessário o desenvolvimento de

outras medidas preventivas para o controle da formação de histamina em espécies de peixes susceptíveis, onde procedimentos possam ser implementados para prevenir sua formação durante o armazenamento e no ponto de venda nos mercados de varejo (BJORNSDOTTIR-BUTLER *et al.*, 2015; LOMARAT *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2011).

Outros fatores importantes também podem afetar o crescimento microbiano, limitando a acumulação de aminas biogênicas nos alimentos, incluindo pH, disponibilidade de oxigênio e a competição com outros microrganismos deteriorantes. Com isso, outras medidas de controle vêm sendo investigadas para aplicação na indústria de alimentos (NAILA *et al.*, 2010; SHALABY, 1996).

Medidas de controle para inibir a formação de aminas biogênicas e a histamina podem incluir a aplicação de pressão hidrostática, irradiação, embalagem e o uso de aditivos alimentares e conservantes. Sendo que, a maioria destes métodos não são novos em termos de preservação de alimentos, mas não são comumente utilizados no controle da formação de aminas biogênicas nos alimentos, podendo agir através da inibição de bactérias ou da atividade das enzimas descarboxilases, responsável pela produção de aminas (NAILA *et al.*, 2010).

Os aditivos e conservantes, com ação antimicrobiana, podem ser eficientes na redução da formação de aminas biogênicas, por inibição do crescimento bacteriano. O uso de aditivos antimicrobianos de origem natural é uma alternativa eficaz, econômica e que atende aos anseios dos consumidores por alimentos naturais e livres de aditivos sintéticos (NAILA *et al.*, 2010; SANTOS, 2010).

Os óleos essenciais extraídos de plantas são fontes de compostos antimicrobianos, por essa razão, diversos autores têm estudado a atividade antimicrobiana dos condimentos e/ou especiarias, assim como de seus óleos essenciais. Extratos de pimenta da jamaica, sálvia, cravo, canela e noz-moscada inibiram a formação de aminas biogênicas por *Enterobacter aerogenes*. Já o aldeído cinâmico, um componente da canela, e o eugenol, um composto do cravo-da-índia, também foram analisados como inibidores eficazes da formação de aminas biogênicas por bactérias específicas (*E. aerogenes*) (MENDONÇA, 2004; NAILA *et al.*, 2010; SANTOS, 2010).

2.5 Biologia molecular na identificação de bactérias

As técnicas tradicionais para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas, na microbiologia de alimentos, fundamentam-se na

utilização de meios de cultura não seletivos e seletivos, complementadas por testes morfológicos e bioquímicos (GANDRA *et al.*, 2008).

Porém, nas últimas décadas, com os avanços nos estudos de biologia molecular, o uso de ferramentas moleculares para detecção e identificação precoce e rápida de microrganismos indesejados nos alimentos tem sido objeto de vários estudos, com aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias de interesse (GANDRA *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2014; LANDETE *et al.*, 2007; POSTOLLEC *et al.*, 2011).

As técnicas da biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), aceleram a obtenção de resultados e permite a prospecção de medidas de controle mais eficientes. Possui vantagens como: rapidez, sensibilidade, simplicidade e especificidade na detecção dos genes alvo (GANDRA *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2014; NELSON; COX, 2011; SILVA-PEREIRA, 2003). Já, as técnicas fenotípicas, comumente utilizadas, demandam maior tempo de análise e, na maioria dos casos, são necessários vários testes para uma identificação em nível de espécie (GANDRA *et al.*, 2008).

A PCR é uma técnica desenvolvida por Kary Mullis em 1983, que consiste em uma reação de polimerização em cadeia, na qual se obtém grandes quantidades de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial (NELSON; COX, 2011; SILVA-PEREIRA, 2003).

O princípio da PCR envolve três etapas básicas, que são repetidas por várias vezes em ciclos: desnaturação térmica do DNA molde; anelamento, a cada uma das fitas do DNA molde, de oligonucleotídeos sintéticos, complementares às sequências do DNA-alvo em fitas opostas, que funcionam como os iniciadores da reação de polimerização (*primers*); e por fim, a polimerização das novas fitas de DNA a partir de cada um dos iniciadores, por uma DNA-polimerase altamente resistente à desnaturação em temperaturas elevadas, utilizando cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP) (NELSON; COX, 2011; SILVA-PEREIRA, 2003). O ciclo de aquecimento, resfriamento e replicação é repetido de 25 ou 30 vezes em um processo automático. A PCR utiliza uma DNA-polimerase termoestável, a Taq DNA polimerase (derivada de *Thermus aquaticus*, uma bactéria que vive a 90 °C), a qual permanece ativa após cada reaquecimento e não precisa ser repostada (NELSON; COX, 2011).

A introdução das técnicas moleculares, em investigações microbiológicas, está se tornando uma alternativa viável aos métodos tradicionais baseados em meios de cultura. São altamente sensíveis e apresentam diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, como maior rapidez, maior poder de tipificação e discriminação, bom limite de detecção,

maior seletividade, especificidade e potencial para automação, além de permitir a possibilidade de trabalhar com células viáveis, mas não cultiváveis nos meios de cultura normalmente utilizados (GANDRA *et al.*, 2008; LANDETE *et al.*, 2007; NELSON; COX, 2011; POSTOLLEC *et al.*, 2011; SOUZA, 2014).

2.6 Óleos essenciais

Desde os primeiros registros históricos, extratos vegetais de plantas aromáticas têm sido utilizados com diferentes fins em alimentos, medicamentos e cosméticos. Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos condimentos e dos seus extratos vegetais, têm despertado grande interesse devido às perspectivas de constituírem uma alternativa natural aos aditivos químicos, pois através de várias pesquisas, pode comprovar-se a eficiência dos óleos essenciais de plantas como agentes antimicrobianos contra a microbiota deterioradora e patogênica de alimentos (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011; MENDONÇA, 2004).

Os antimicrobianos alimentares são compostos adicionados ou presentes em alimentos com a função de retardar ou inibir o desenvolvimento microbiano, porém, a utilização indiscriminada e prolongada desses antimicrobianos tem levado à seleção de cepas microbianas progressivamente mais resistentes a diferentes substâncias. A realidade de números cada vez maiores de bactérias mono e multirresistentes às substâncias antimicrobianas utilizadas, rotineiramente, despertou o interesse para a busca de novos compostos antimicrobianos para a aplicação em alimentos (HUI *et al.*, 2017; SOUZA, 2006; TIPPAYATUM; CHONHENCHOB, 2007).

Os óleos essenciais de plantas são agentes antimicrobianos naturais e considerados de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana, uma vez que são compostos por várias substâncias, que, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de ação antimicrobiana, tornando mais difícil a adaptabilidade pelos microrganismos (DAFERERA *et al.*, 2000).

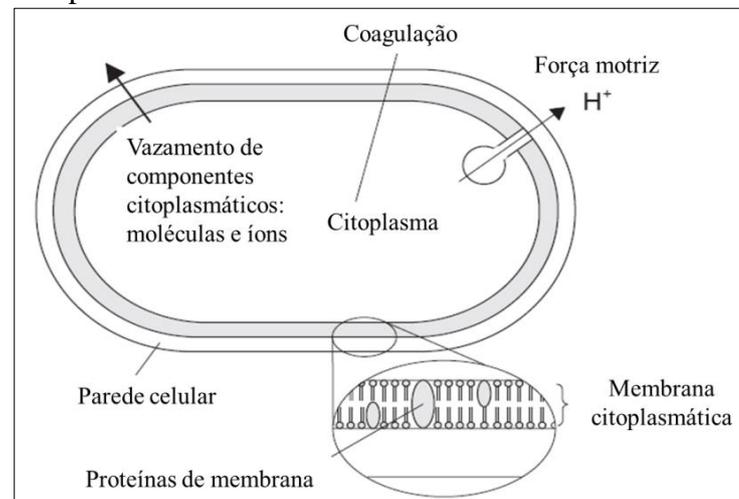
Originados do metabolismo secundário das plantas são compostos biodegradáveis e voláteis que estão presentes em muitos órgãos vegetais, como flores, folhas, sementes, raízes, cascas e frutos. Possuem propriedades antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, inseticida, antiviral e/ou antioxidante, que podem estar relacionadas com as funções que exercem nas próprias plantas (ARIDOGAN *et al.*, 2002; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; SIQUI *et al.*, 2000). Esses óleos possuem composição química complexa,

podendo conter mais de 60 componentes em diferentes proporções. Caracterizam-se pela presença de dois ou três compostos majoritários, que, em geral, determinam a sua propriedade biológica. Porém, existem evidências de que os componentes minoritários também desempenham papel fundamental na atividade antibacteriana dos óleos, possivelmente pela produção de efeito sinérgico com outros componentes (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011; SANTOS, 2010).

A composição química do óleo essencial de uma determinada planta pode variar em função da época de colheita, da origem geográfica e das diferentes partes utilizadas (DELAQUIS *et al.*, 2002).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída à presença de compostos fenólicos, aldeídos, terpenos, álcoois alifáticos, cetonas, ácidos e isoflavonóides. (TURINA *et al.*, 2006). A ação desses óleos envolve múltiplos alvos dentro da célula, não sendo atribuível a um mecanismo específico (FIGURA 2).

Figura 2 – Prováveis locais e mecanismos de ação dos componentes dos óleos essenciais na célula bacteriana.



Fonte: Adaptado de Burt (2004).

Os óleos essenciais e seus componentes possuem a capacidade de alterar a permeabilidade e integridade da membrana celular e mitocondrial dos microrganismos, tornando-as mais permeáveis com consequentes perdas de componentes citosólicos, íons e moléculas, alterando as estruturas celulares e rompendo a homeostase (BURT, 2004; DONSI; FERRARI, 2016; GUO *et al.*, 2017). Como por exemplo, os compostos fenólicos, que alteram a permeabilidade da membrana celular, permitindo assim a perda de macromoléculas, como a ribose; e podem ainda interagir com proteínas da membrana celular causando deformação na

sua estrutura e funcionalidade (BAJPAI; RAHMAN; KANG, 2008; BURT, 2004; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Porém, apesar de os possíveis modos de ação dos constituintes dos óleos essenciais de plantas, como agentes antimicrobianos, já terem sido analisados em diferentes estudos, os exatos mecanismos específicos de ação ainda não foram estabelecidos (BAKKALI *et al.*, 2008; BURT, 2004).

A extração dos óleos essenciais das plantas é geralmente realizada através da técnica de destilação por arraste com vapor de água, ou pela prensagem do pericarpo de algum fruto cítrico, podendo ser aplicados como coadjuvantes em medicamentos ou nas áreas alimentícia, cosmética e de perfumaria (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; BURT, 2004). Todavia, antes de sua aplicação em alimentos, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada na compatibilidade química e sensorial deste com o alimento alvo e que sejam conhecidas cada uma de suas propriedades, como por exemplo, o seu modo de ação, a sua efetividade contra os microrganismos alvos, a influência da matriz dos alimentos e a sua segurança toxicológica. É imprescindível que seja estabelecido um equilíbrio entre a sua eficiência antimicrobiana, segurança e aceitação sensorial do produto ao qual foi adicionado (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; SETTANNI; CORSETTI, 2008).

2.6.1 Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma especiaria pertencente à família Lamiaceae, conhecida desde a antiguidade por seus efeitos medicinais. É comumente utilizado com fins culinários, medicinais e aromáticos, sendo o óleo essencial aplicado em cosméticos e perfumaria. Recentemente, diversos pesquisadores têm mostrado interesse por suas propriedades antioxidante e antimicrobiana. É uma planta nativa do Mediterrâneo e seu nome em latim, “Rosmarinus”, significa “o orvalho que vem do mar”, em alusão ao seu aroma abundante das praias mediterrâneas onde o alecrim crescia e se desenvolvia espontaneamente (AFONSO *et al.*, 2008; FARIA, 2005; RIBEIRO, 2011).

Segundo Porte e Godoy (2001), os monoterpenos são os compostos predominantes do óleo essencial de alecrim, sendo os compostos hidroxilados, carbonilados e os epóxidos os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana. De acordo com análises da composição química do óleo essencial de alecrim, realizadas por Ribeiro (2011), os principais componentes encontrados foram o α -pineno (19,8%), β -mirceno (24,2%), 1,8 cineol (22,2%) e verbenona (9,3%), correspondendo a 75,5% do total do óleo.

Porém, ainda segundo Ribeiro (2011), a composição do óleo essencial de alecrim pode variar quantitativa e/ou qualitativamente, devido às particularidades da região de cultivo da planta.

Os monoterpenos, presentes no óleo essencial de alecrim, exercem sua atividade antimicrobiana através do rompimento da integridade da membrana das bactérias, ação facilitada pela característica hidrofóbica dos óleos essenciais, que permite a penetração de compostos lipídicos nas mitocôndrias e na membrana celular, rompendo a estrutura das células e resultando na saída de moléculas importantes de dentro da célula, provocando assim, a morte da bactéria (BURT, 2004).

Ribeiro (2011), ao avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim contra bactérias isoladas de alimentos, verificou que todos os microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva) foram susceptíveis a ação do óleo essencial. Os valores de concentração inibitória mínima (concentração mínima capaz de inibir o desenvolvimento microbiano), do óleo essencial de alecrim para as cepas de *Escherichia coli* (EC16, MOA46 e MOA51), de *Salmonella* spp. (MOA25 e SAL.16) e *Staphylococcus* coagulase positiva (SA06) foi de 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (20% v v⁻¹) e para a cepa de *Salmonella* (MOA23) foi de 400 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (40% v v⁻¹).

2.6.2 Óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum* L.)

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L., família Myrtaceae) é uma planta arbórea, endêmica, originária das Ilhas Molucas (Indonésia), com forte odor aromático, sabor ardente e característico, com enorme potencial como conservante alimentar com ação contra bactérias patogênicas e deteriorantes. Os cravos comerciais são os botões de flores secas e não expandidas, que são usados como condimentos ou especiarias em muitos alimentos, e em aplicações farmacêuticas (EL-MAATI *et al.*, 2016; SANTOS, 2010).

O óleo extraído da planta contém de 70 a 95% de eugenol livre (4-alil-2-metoxifenol), um fenol largamente distribuído no reino vegetal, principalmente como constituinte de óleos essenciais de plantas. O eugenol é o principal constituinte químico presente na especiaria e apresenta efeitos anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico e antimicrobiano (SANTOS, 2010).

O possível mecanismo de ação do eugenol está relacionado com sua natureza fenólica e ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas

e/ou no material genético celular. É comumente utilizado como antimicrobiano e antifúngico, por possuir amplo espectro de ação (SANTOS, 2010).

Trajano *et al.* (2009), em estudo sobre a atividade antibacteriana de óleos essenciais de cravo, sobre cepas de bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7664) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), e sobre cepas de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4362), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* (ATCC 6017), *Serratia marcescens* (ATCC 13880) e *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610), constataram que este óleo essencial inibiu todas as bactérias testadas com formação de halos de inibição de até 30 mm de diâmetro.

Já Santos (2010), ao avaliar o efeito de óleos essenciais na conservação de vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*), concluiu que o óleo essencial de cravo foi eficaz na inibição de cepas de *Salmonella* spp., tornando-se uma alternativa eficaz para a conservação deste produto, conservando-o em níveis microbiologicamente aceitáveis por até 120 horas de armazenamento.

Shakila, Vasundhara e Rao (1996), em investigação sobre o efeito do cravo na produção de histamina e outras aminas biogênicas e na atividade de histidina descarboxilase de *Morganella morganii*, em cavalas armazenadas a 30 °C, concluiu que o extrato de cravo foi eficaz na inibição da produção de histamina e da atividade da enzima histidina descarboxilase de *M. morganii* e também eficaz na inibição de outras aminas biogênicas presentes. Portanto, a aplicação desta especiaria pode prolongar a vida útil dos peixes susceptíveis à formação de histamina.

2.6.3 Óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma planta da família Zingiberaceae originária do Sudeste Asiático e foi uma das primeiras especiarias a ser conhecida na Europa por volta do século IX. Possui rizoma ramificado, de cheiro e sabor picante e agradável, o qual é amplamente utilizado como especiaria na culinária, além de ser bem conhecido na medicina tradicional e por sua atividade antimicrobiana (MAGALHÃES *et al.*, 1997; ZANCAN, 2001).

Singh *et al.* (2008), em estudo sobre a composição química do óleo essencial de gengibre, identificaram 57 compostos no óleo essencial. De acordo com estudo realizado por Andrade *et al.* (2012), os compostos majoritários presentes no óleo essencial de gengibre são

os monoterpenos oxigenados, geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%) e acetato de geranila (4,19%) e o monoterpeneo bicíclico, canfeno (4,30%). Esses resultados corroboram com os valores encontrados por Majolo *et al.* (2014), que identificaram como compostos majoritários do óleo essencial de gengibre o geranial (23,9%), neral (17,2%), 1,8-cineol (16,0%) e canfeno (11,4%). Porém, a composição do óleo essencial de gengibre pode variar de acordo com a origem geográfica, secagem, época de colheita e tipo de adubação (MARTINS, 2010).

Majolo *et al.* (2014), ao avaliarem a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre frente a 14 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de frango resfriado, obtiveram como concentração inibitória mínima a variação de 2500 a 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de concentração bactericida mínima a variação de 5000 a 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Segundo Singh *et al.* (2008), a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre deve-se às quantidades consideráveis de compostos fenólicos presentes, no entanto, é provável que a eficiência global do óleo essencial seja resultante da ação sinérgica de todos os seus constituintes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Foram realizadas quatro coletas, uma coleta por mês, no período de maio a agosto de 2017. Cada coleta foi composta por dois espécimes de cavalas (*Scomberomorus cavalla*) resfriadas, com pesos que variaram entre 0,8 kg a 3 kg, comprimento total de 55 a 81 cm e comprimento furcal de 50 a 73 cm.

As cavalas foram obtidas do Mercado dos Peixes, localizado no Bairro Mucuripe do município de Fortaleza-CE. Imediatamente após cada coleta, os peixes foram acondicionados em caixas isotérmicas e transportados ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), do Instituto de Ciências do Mar (Labomar), da Universidade Federal do Ceará, para os procedimentos das análises microbiológicas.

3.2 Processamento das amostras

Em laboratório, o muco da pele da cavala foi colhido por esfregação usando *swab* embebido em solução salina 1% de NaCl, de uma área total de 100 cm², tanto do lado direito, quanto do lado esquerdo, de cada espécime (FIGURA 3).

Figura 3 – Obtenção do muco superficial da pele da cavala (*Scomberomorus cavalla*) através de esfregação com *swab*.



Fonte: Própria autora.

A obtenção da microbiota das brânquias também foi realizada através de esfregação com *swab* embebido em solução salina 1% de NaCl, em toda a superfície das brânquias do lado direito e do lado esquerdo de cada espécime (FIGURA 4).

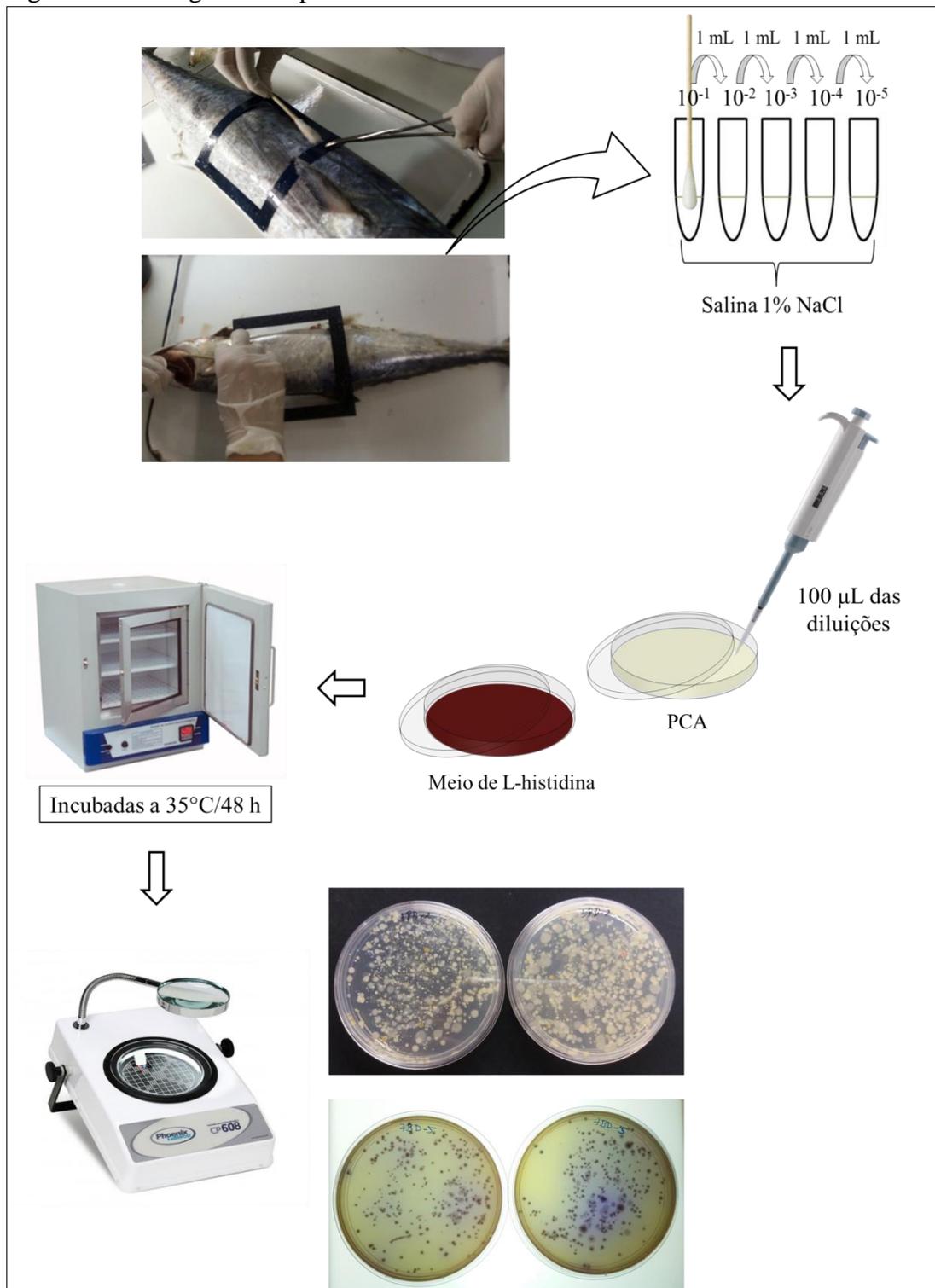
Figura 4 – Esfregação com *swab* na superfície das brânquias.



Fonte: Própria autora.

As amostras foram então submetidas a diluições seriadas até 10^{-5} usando solução salina 1% NaCl como diluente. Alíquotas de 100 μL de cada diluição foram inoculadas, pela técnica de *spread plate*, em duplicata, em meio de cultura Ágar de Contagem em Placas (PCA) (Difco®), para a quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e em meio diferencial para bactérias produtoras de histamina (BPH), para a quantificação das BPH. As placas inoculadas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 35 °C (FIGURA 5).

Figura 5 – Fluxograma do processamento das amostras.



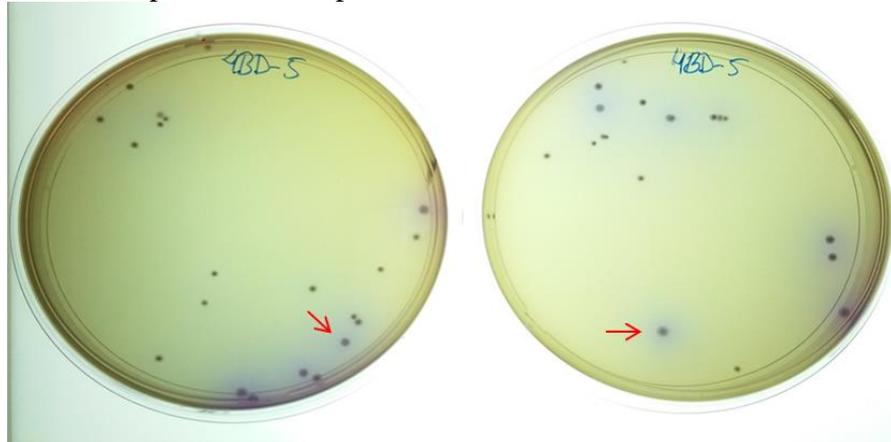
Fonte: Elaborada pela autora.

O meio diferencial utilizado para as BPH foi descrito por Niven, Jeffrey e Corlett (1981) com modificações, de acordo com Mavromatis e Quantick (2002), composto por: 0,5% de caldo triptona, 0,5% de extrato de levedura, 2% de L-histidina.2HCl, 0,5% de NaCl, 0,1% de CaCO_3 , 3,0% de Ágar e 0,006% do indicador púrpura de bromocresol (pH 5,3).

3.3 Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis e de bactérias produtoras de histamina

Após o período de incubação, as placas das diluições com crescimento entre 25 e 250 colônias foram escolhidas para o cálculo das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), segundo recomendações de Downes e Ito (2001). Em meio diferencial para BPH, além da contagem do total de colônias, foram contadas as colônias com coloração roxa e com halo (FIGURA 6), resultado do aumento do pH do meio após a formação de histamina, de acordo com Niven, Jeffrey e Corlett (1981).

Figura 6 – Colônias com coloração roxa e com halo em meio diferencial para bactérias produtoras de histamina.



Fonte: Própria autora.

Os resultados das contagens para o muco da pele da cavala foram expressos em Log UFC/cm², utilizando a Equação 1.

$$\text{Log UFC/cm}^2 = \text{Log} \left(\left(\frac{a+b}{2} \times 10^n \times FC \right) \div 100 \right) \quad (1)$$

Já os resultados para as contagens das colônias das brânquias foram expressos em Log UFC/brânquia, utilizando a Equação 2.

$$\text{Log UFC/brânquia} = \text{Log} \left(\frac{a+b}{2} \times 10^n \times FC \right) \quad (2)$$

Onde:

a e b = contagem placas em duplicata;

10^n = inverso da diluição;

FC = fator de correção (fator de correção igual a 10, para *spread plate* feito com 100 μ L).

3.3.1 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial, utilizando o *software* Sisvar®. Foram analisadas as interações entre as contagens das bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e das bactérias produtoras de histamina (BPH), total e com halo, entre as quatro coletas.

Os fatoriais analisados para pele e brânquias foram: BHC, BPH total e BPH com halo (3) x coletas (4). Os dados foram analisados a partir de análise de variância (ANOVA), a fim de avaliar se existe diferença significativa ($p \leq 0,05$) e para a comparação entre as médias utilizou-se o teste de Tukey com 5% de significância (FERREIRA, 2011).

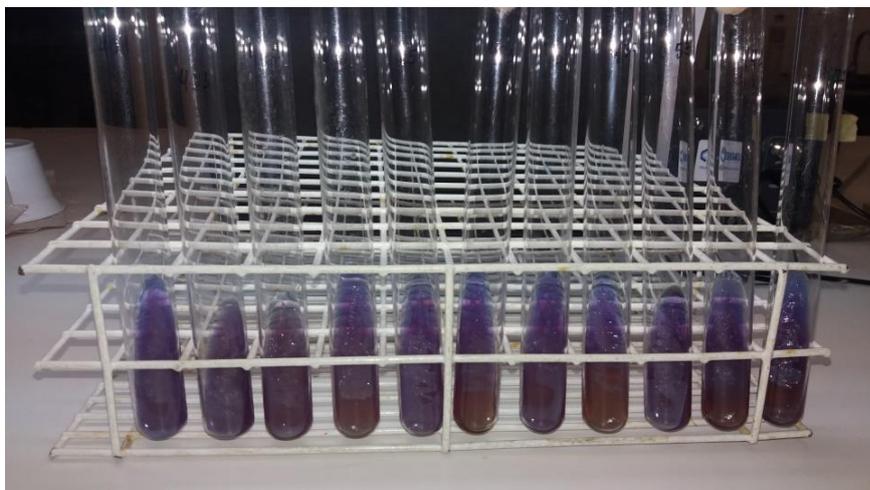
3.4 Isolamento e identificação das cepas bacterianas produtoras de histamina

3.4.1 Isolamento

As colônias que apresentaram coloração roxa e com halo nas placas com meio diferencial para bactérias produtoras de histamina (NIVEN; JEFFREY; CORLETT, 1981; MAVROMATIS; QUANTICK, 2002) foram isoladas e transferidas para tubos com o mesmo meio diferencial e incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 48 horas, para posterior identificação.

Os isolados presuntivamente produtores de histamina foram considerados confirmados para a produção de histamina, com o desenvolvimento de coloração roxa intensa, em tubos com o meio diferencial, como resultado da alcalinização do meio pela presença de histamina (FIGURA 7).

Figura 7 – Tubos de ensaio com os isolados bacterianos produtores de histamina, com resultado positivo para a produção de histamina em meio diferencial.



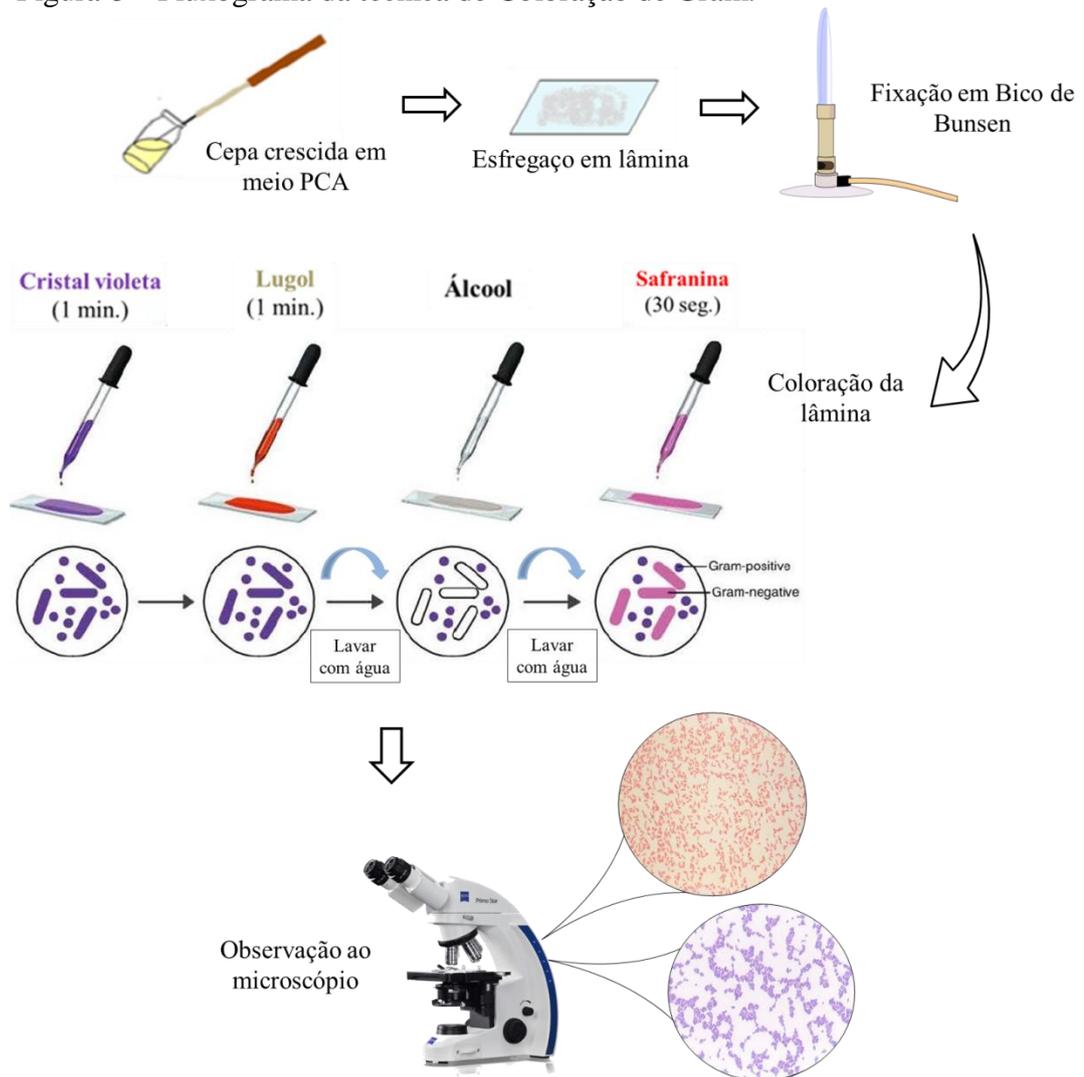
Fonte: Própria autora.

3.4.2 Classificação morfofintorial das bactérias produtoras de histamina isoladas

As cepas bacterianas produtoras de histamina isoladas foram primeiramente analisadas quanto às características morfológicas e estruturais da parede celular, através da técnica de coloração de Gram (FIGURA 8), a qual classifica as bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas ou Gram negativas, baseado na diferença de composição da parede celular e na capacidade dessa em reter o corante (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Para isso, os isolados foram renovados em meio de cultura não seletivo (Ágar de Contagem em Placas) e incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas.

Figura 8 – Fluxograma da técnica de Coloração de Gram.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.3 Identificação das bactérias produtoras de histamina

3.4.3.1 Extração do DNA total

As culturas puras foram inoculadas em caldo contendo histidina (NIVEN; JEFFREY; CORLETT, 1981) e incubadas a 35°C por 48 horas. Após este período, retirou-se uma alíquota de 1 mL do inóculo para a extração do DNA total utilizando kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

A eficiência do protocolo foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão de Tris-EDTA (45 mM; pH 7,8 [1 mM EDTA]), a 120V e registrado em

equipamento de fotodocumentação digital (Kodak® EDAS290). Todas as amostras de DNA extraídas foram mantidas a 4 °C até a reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.4.3.2 Amplificação do DNA (região 16S DNAr) e sequenciamento

A partir do DNA total extraído, foi realizada a amplificação de sequências universalmente conservadas nos genes 16S rDNA bacteriano, através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores universais 1401L (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CC - 3') e 968U (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC- 3'), descritos por Lopez *et al.* (2003).

O Mix da reação de PCR foi preparado para um volume final de 50 µL, com composição e condições de termociclagem descritas na Tabela 1. As amplificações foram realizadas em termociclador AmpliTherm modelo TX96. Como padrão para a reação foi utilizado uma amostra de DNA de uma cepa padrão de *Vibrio parahaemolyticus* (IOC 18950).

Tabela 1 – Composição do Mix de reagentes e condições de termociclagem utilizados nas reações de amplificação.

Composição do Mix		Condições de termociclagem	
Reagente	Volume		
DNA extraído	2 µL	Desnaturação	94 °C/ 2 min.
H ₂ O ultrapura	Até completar o volume final		
Primer 1401L	0,4 µL	Desnaturação/	30 ciclos:
Primer 968U	0,4 µL	anelamento	94 °C/ 1 min.; 52 °C/ 1 min.;
			72 °C/ 2 min.
MgCl ₂	0,8 µL		
dNTP	0,4 µL	Extensão final	72 °C/ 8 min.
Tampão 1x	4 µL		
Taq DNA polimerase	0,4 µL		

Fonte: Elaborada pela autora.

Os produtos de amplificação foram analisados através de eletroforese em gel agarose 1%, visualizados e registrados usando equipamento de fotodocumentação digital

(Kodak® EDAS290). Foi utilizado um marcador molecular de 1kb DNA ladder (Sigma®) para visualizar o tamanho dos *amplicons* gerados.

Os *amplicons* obtidos foram enviados ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – Pernambuco), para a realização dos sequenciamentos, utilizando sequenciador automático 3500xL Genetic Analyzer for Human Identification (Applied Biosystems), tendo como princípio o método descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977). As sequências obtidas foram analisadas no programa BLAST (ALTSCHUN *et al.*, 1997) e comparadas as sequências da base de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

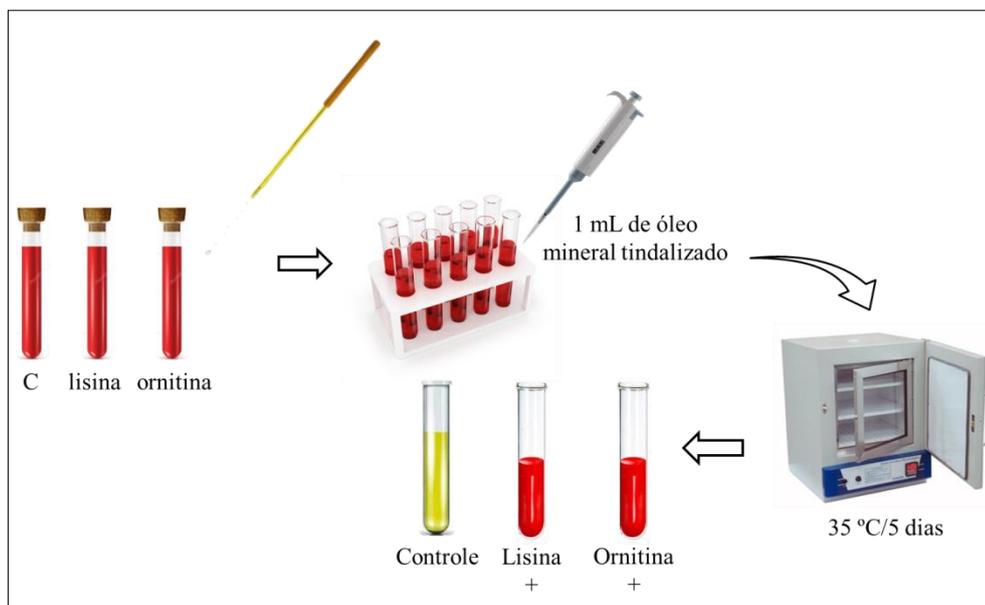
3.5 Avaliação da produção de outras aminas biogênicas

As cepas bacterianas produtoras de histamina foram avaliadas qualitativamente quanto à capacidade de produzirem cadaverina e putrescina, através da descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, respectivamente.

Para isso, cada cepa foi inoculada com o auxílio de uma alça de níquel-cromo em três tubos de ensaio: dois tubos contendo o meio basal (caldo com o indicador vermelho de fenol) e 0,5% dos aminoácidos a serem testados (lisina e ornitina) e um tubo contendo o mesmo meio basal, porém sem qualquer aminoácido (controle). Após a inoculação, a cada tubo foi acrescentado 1 mL de óleo mineral tinalizado (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2001).

Em seguida foi feito a incubação em estufa bacteriológica a 35 °C por até 5 dias. O meio inoculado tem viragem primeiramente para amarelo, como resultado da produção de ácido, originário da glicose existente no meio basal. Quando ocorre a descarboxilação do aminoácido, o meio torna-se alcalino, de cor avermelhada, porém o tubo controle permanece ácido, de cor amarela (FIGURA 9).

Figura 9 – Fluxograma do Teste de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente às bactérias produtoras de histamina

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim, cravo-da-índia (botões) e gengibre foi avaliada frente às cepas bacterianas produtoras de histamina selecionadas. Foi considerado como critério para a seleção das cepas bacterianas produtoras de histamina, a capacidade das mesmas em produzirem também outras aminas biogênicas, no caso putrescina e cadaverina.

Os óleos essenciais utilizados foram obtidos da Empresa Ferquima Ind. e Com. Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), os quais foram extraídos por destilação por arraste de vapor.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi realizada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou seja, a concentração mínima capaz de inibir o desenvolvimento microbiano, a qual foi determinada para cada microrganismo selecionado, utilizando-se a técnica de difusão em discos, segundo o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2010).

Com base em alguns estudos, foram avaliadas as concentrações de $100 \mu\text{L mL}^{-1}$, $500 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$ dos óleos essenciais de alecrim (RIBEIRO, 2011), cravo-da-índia (SANTOS, 2010) e gengibre (MAJOLO *et al.*, 2014).

Como diluente foi utilizado Tween 80, na concentração de 10% (v v⁻¹), o qual também foi utilizado como controle negativo para as análises das CIM. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico Cloranfenicol na concentração de 30 µg mL⁻¹ (BD®).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação de bactérias heterotróficas cultiváveis e de bactérias produtoras de histamina do muco superficial da pele e das brânquias

As contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) e de bactérias produtoras de histamina (BPH) da superfície da pele da cavala (*Scomberomorus cavalla*) foram de 4,52 Log UFC/cm² para as BHC, 4,67 Log UFC/cm² para as BPH no total e 4,16 Log UFC/cm² para as BPH com coloração roxa e halo (TABELA 2).

Com relação aos meses de coletas avaliados, não houve diferença significativa das quantificações dentro do período de maio a agosto de 2017 para o muco superficial de pele da cavala (TABELA 2).

Tabela 2 – Contagem Padrão em Placas (CPP) em Log UFC/cm² de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e de Bactérias Produtoras de Histamina (BPH) do muco superficial da pele da cavala (*Scomberomorus cavalla*).

Bactérias	Coletas				Média
	Maio	Junho	Julho	Agosto	
BHC	4,65 aA	4,40 aA	4,46 aA	4,55 aA	4,52 ab
BPH total	4,47 aA	4,75 aA	4,69 aA	4,76 aA	4,67 a
BPH halo	3,90 aA	4,17 aA	4,26 aA	4,32 aA	4,16 b
Média	4,34 A	4,44 A	4,47 A	4,54 A	

Fonte: Elaborada pela autora.

Letras maiúsculas diferentes em colunas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

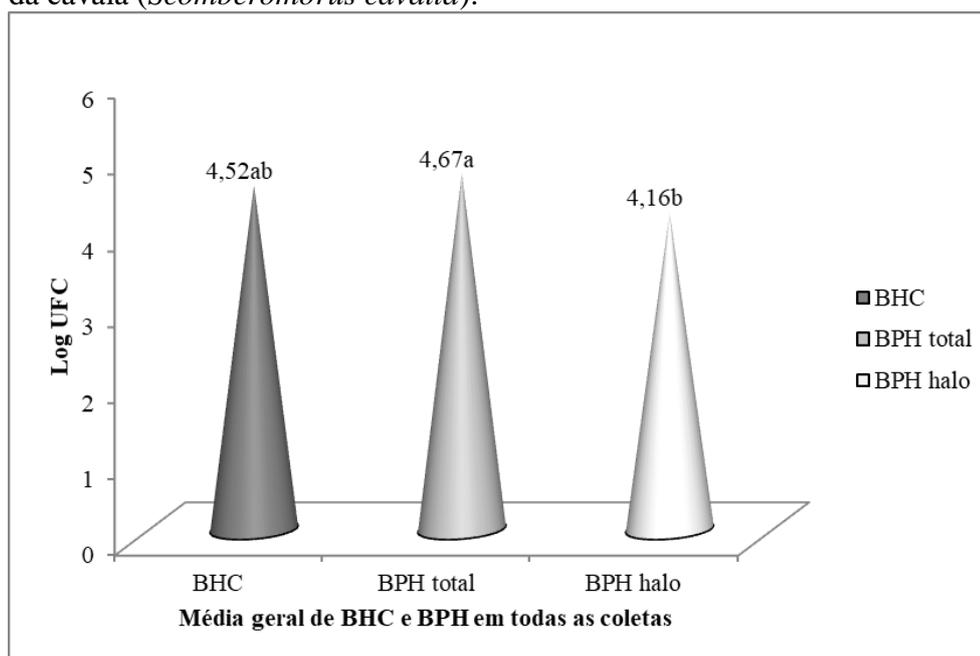
Letras minúsculas diferentes em linhas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

DMS = diferença mínima significativa. DMS bactérias = 0,39. DMS coletas = 0,49. DMS bactérias x coletas = 0,78. DMS coletas x bactérias = 0,86.

Ao analisar as quantificações do muco superficial da pele da cavala, pode se verificar que o número de BHC não diferiu estatisticamente do número de BPH no total, nem do número de BPH com halo (GRÁFICO 1). Diferentemente do encontrado por Kim *et al.* (2001a), ao avaliarem BHC e BPH de albacoras (*Thunnus alalunga*), provenientes da costa de Óregon. Segundo os autores, as contagens de BPH positivas (coloração roxa com halo) em meio diferencial de Niven, Jeffrey e Corlett (1981), foram geralmente inferiores às obtidas em ágar padrão, em aproximadamente um ciclo logarítmico.

Quanto ao número de BPH do muco superficial da cavala, o número total de colônias em meio diferencial para BPH foi significativamente superior ao número de BPH com resultado positivo para a produção de histamina, em meio diferencial. Portanto, algumas bactérias são capazes de crescer no meio diferencial para BPH de Niven, Jeffrey e Corlett (1981), sem apresentarem colônias com coloração roxa e com halo (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 – Quantificação das BHC e das BPH no muco superficial da pele da cavala (*Scomberomorus cavalla*).



Fonte: Elaborado pela autora.

Letras minúsculas diferentes em colunas de cores diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

DMS = diferença mínima significativa. DMS bactérias = 0,39.

Ao avaliar as bactérias presentes nas brânquias, o número foi significativamente maior de bactérias que cresceram no meio diferencial para produtoras de histamina do que as BHC em meio não seletivo (TABELA 3).

Em relação ao período de coletas, a média geral das quantificações por Contagem Padrão em Placas (CPP) para as brânquias, no mês de agosto, foi significativamente maior, do que nos meses de maio, junho e julho (TABELA 3).

Tabela 3 – Contagem Padrão em Placas (CPP) em Log UFC/brânquia de Bactérias Heterotróficas Cultiváveis (BHC) e de Bactérias Produtoras de Histamina (BPH) das brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*).

Bactérias	Coletas				Média
	Maio	Junho	Julho	Agosto	
BHC	5,51 aA	4,98 bA	5,72 aA	5,91 bA	5,53 b
BPH total	6,36 aB	6,41 aB	6,31 aB	8,13 aA	6,8 a
BPH halo	5,71 aB	5,67 abB	5,79 aB	7,64 aA	6,2 a
Média	5,86 B	5,69 B	5,94 B	7,23 A	

Fonte: Elaborada pela autora.

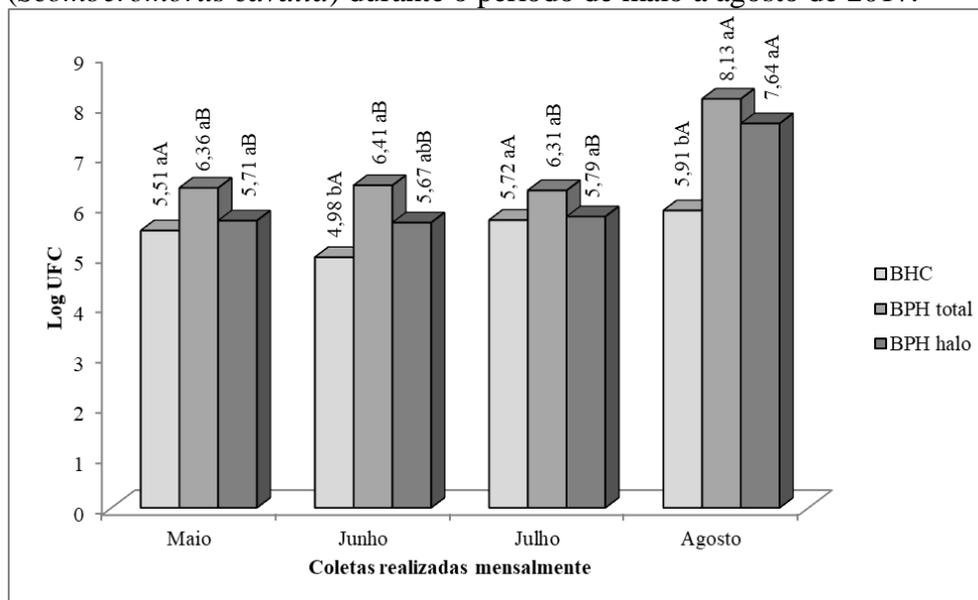
Letras maiúsculas diferentes em colunas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes em linhas diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

DMS = diferença mínima significativa. DMS bactérias = 0,62. DMS coletas = 0,79. DMS bactérias x coletas = 1,24. DMS coletas x bactérias = 1,36.

Porém, como ilustrado no Gráfico 2, as quantificações das BHC das brânquias da cavala não apresentaram diferença significativa entre os meses de coleta avaliados. Portanto, somente houve influencia da época do ano para as contagens das BPH das brânquias, tanto para o crescimento total, como para as com coloração roxa e com halo.

Gráfico 2 – Quantificação de BHC e de BPH das brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*) durante o período de maio a agosto de 2017.



Fonte: Elaborado pela autora.

Letras maiúsculas diferentes em colunas de mesma cor diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes em colunas de cores diferentes, dentro de cada mês, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

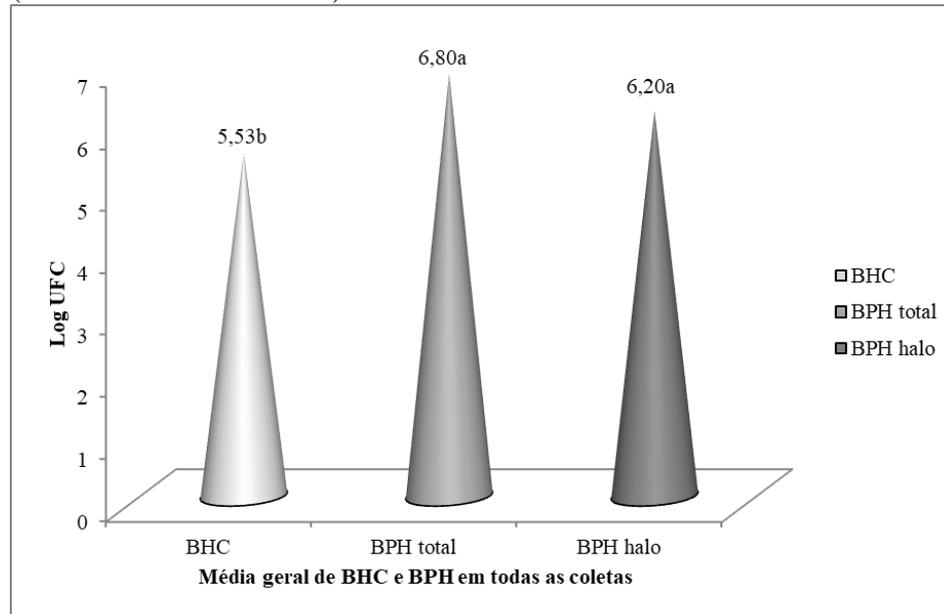
DMS = diferença mínima significativa. DMS bactérias x coletas = 1,24. DMS coletas x bactérias = 1,36.

No Estado do Ceará, o período chuvoso ou “quadra chuvosa” ocorre entre os meses de fevereiro a maio e a pós-estação entre junho e julho. Já o mês de agosto marca o início da estação seca, a qual se estende de agosto a novembro, na maior parte da região (GUEDES *et al.*, 2005; MARENGO *et al.*, 2011).

Segundo Evangelista (2010), o aumento da temperatura ambiente em determinadas épocas do ano, acarreta uma maior susceptibilidade ao crescimento microbiano. Como em peixes, as BPH fazem parte da microbiota natural, a mesma é influenciada pelo tipo de *habitat* aquático, localização geográfica, assim como, a estação do ano e a temperatura do oceano (BJORNSDOTTIR-BUTLER *et al.*, 2011; FAO/WHO, 2013; SINGH *et al.*, 2012; TAYLOR, 1985).

Quanto às quantificações das brânquias da cavala, pode se verificar que o número de BPH, tanto o total, como as com coloração roxa e com halo, foi significativamente superior ao número de BHC (GRÁFICO 3). Já nas contagens somente das BPH das brânquias da cavala, não houve diferença estatística entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas em meio diferencial para BPH e aqueles que apresentaram resultado positivo em meio diferencial, ou seja, coloração roxa com halo (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 – Quantificação das BHC e das BPH das brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*).



Fonte: Elaborado pela autora.

Letras minúsculas diferentes em colunas de cores diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

DMS = diferença mínima significativa. DMS bactérias = 0,62.

Portanto, nas brânquias da cavala, os microrganismos capazes de crescerem em meio diferencial para BPH, estatisticamente, também apresentaram resultado positivo para a produção de histamina. Diferentemente do encontrado na quantificação das BPH para a pele da cavala (GRÁFICO 1), na qual o número total de UFC crescidas em meio diferencial para BPH foi, significativamente, superior ao número de UFC com resultado positivo para a produção de histamina (coloração roxa com halo).

De acordo com Kim *et al.* (2001a), BPH isoladas das brânquias de albacoras (*Thunnus alalunga*), provenientes da costa de Óregon, produziram níveis mais altos de histamina do que as BPH da pele. Este fato pode ser devido as brânquias serem órgãos polivalentes, que desempenham um papel central em um conjunto de respostas fisiológicas às mudanças ambientais e internas. As funções das brânquias envolvem, além da troca de gases respiratórios, a osmorregulação, regulação de pH e excreção de compostos nitrogenados (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; SCHMIDT-NIELSEN, 2013).

As brânquias dos peixes são compostas por um epitélio de alta área superficial, altamente vascularizado e com uma fina barreira entre o sangue e o ambiente aquático, o que pode propiciar condições favoráveis para o crescimento bacteriano, como a disponibilidade de nutrientes e aminoácidos livres (BRINK *et al.*, 1990; EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; SHALABY, 1996).

4.2 Isolamento e identificação das bactérias produtoras de histamina

Foram isoladas ao todo 113 cepas de bactérias produtoras de histamina, destas 99 (87,61%) Gram negativas (bastonetes) e 14 (12,39%) Gram positivas (03 cocos e 11 bastonetes). Sendo 67 (59,29%) isoladas do muco superficial da pele (59 Gram negativas e 08 Gram positivas) e 46 (40,71%) isoladas das brânquias (40 Gram negativas e 06 Gram positivas).

Na literatura, as bactérias Gram negativas entéricas e mesofílicas são relacionadas com a produção de histamina em peixes, enquanto bactérias produtoras de histamina Gram positivas são mais comumente associadas com produtos fermentados como salame, queijo, chucrute e vinho (BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER; GREEN, 2010). Diferente do encontrado neste estudo, já que foram isoladas bactérias produtoras de histamina Gram positivas tanto do muco superficial da pele, como das brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*), mesmo que em menores números comparado ao número de isolados Gram negativos.

A maioria dos estudos referentes à ocorrência de histamina em pescado se restringe a espécies do ambiente marinho de regiões temperadas ou de clima frio (SILVEIRA, 2002). Entretanto, a microbiota natural do pescado de regiões frias e temperadas (predominantemente composta por bactérias Gram negativas), difere qualitativamente da microbiota natural do pescado de águas tropicais, a qual é composta por bactérias Gram negativas e também por numerosas espécies de bactérias Gram positivas, como *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Bacillus* (JAY, 2005; VIEIRA, 2004).

Segundo Hu, Huang e Chen (2014), vários gêneros, tanto de bactérias Gram negativas ou Gram positivas, estão simultaneamente presentes nos peixes e são capazes de produzir histamina, como *Arthrobacter bergeri* uma bactéria Gram positiva, produtora de histamina, isolada de *Decapterus maruadsi*, capturado no sudeste do mar da China.

Portanto, a microbiota formadora de histamina em cada peixe é única e pode variar de acordo com a localização geográfica, tipo de habitat aquático, estação do ano, temperatura do oceano e hábito alimentar dos peixes (BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER *et al.*, 2011; FAO/WHO, 2013; FENG; TEUBER; GERSHWIN, 2016).

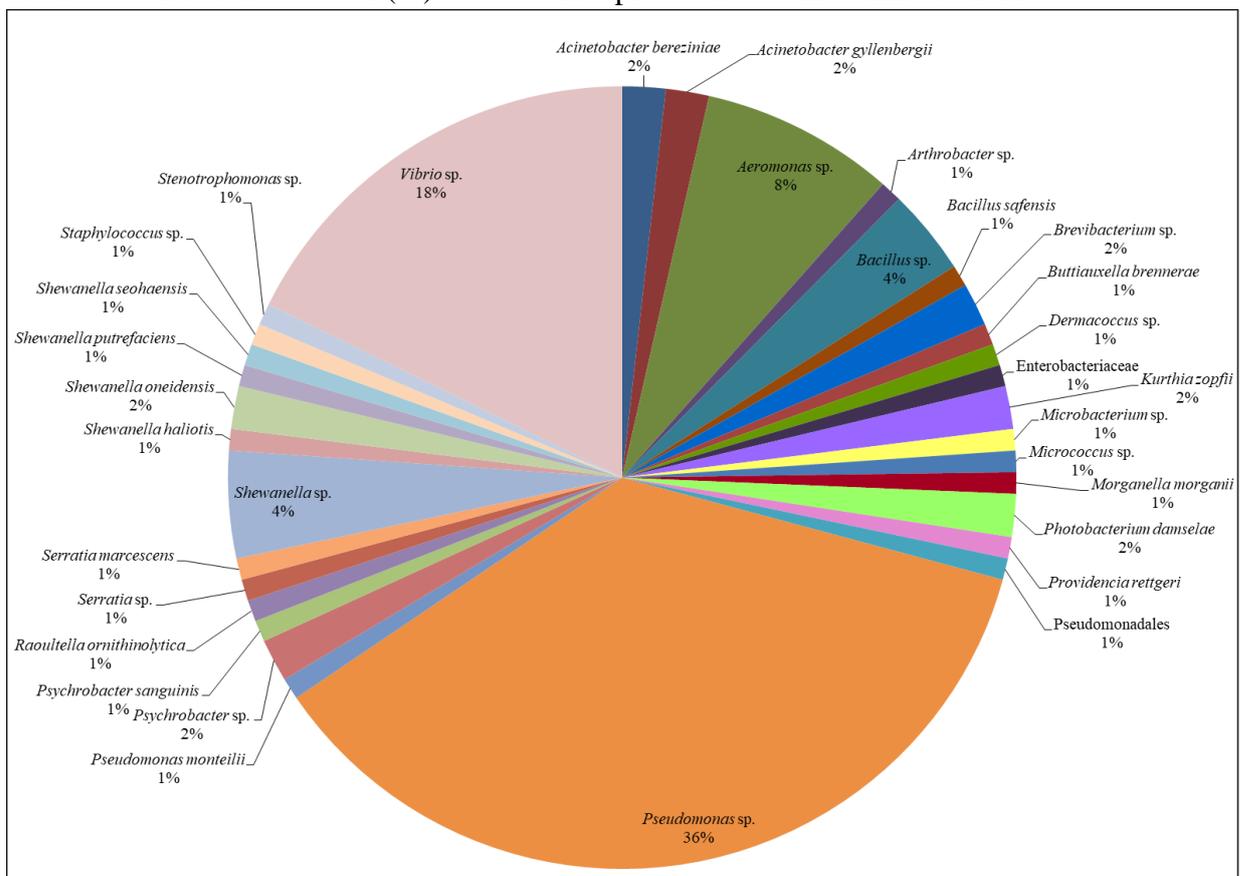
4.2.1 Identificação genotípica

Os isolados bacterianos produtores de histamina foram identificados no nível de espécie (16): *Acinetobacter bereziniae*, *Acinetobacter gyllenbergii*, *Bacillus safensis*,

Buttiauxella brennerae, *Kurthia zopfii*, *Morganella morganii*, *Photobacterium damsela*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas monteilii*, *Psychrobacter sanguinis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *Shewanella haliotis*, *Shewanella oneidensis*, *Shewanella putrefaciens* e *Shewanella seohaensis*; até nível de gênero (14): *Aeromonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Brevibacterium* spp., *Dermacoccus* spp., *Microbacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Serratia* spp., *Shewanella* spp., *Staphylococcus* spp., *Stenotrophomonas* spp. e *Vibrio* spp.; a nível de família: Enterobacteriaceae e ordem: Pseudomonadales (APÊNDICE B).

Quanto a diversidade total de bactérias produtoras de histamina identificadas (GRÁFICO 04), as mais abundantes foram as bactérias do gênero *Pseudomonas*, representando 36% do total, além da espécie *Pseudomonas monteilii* (1%). Bactérias dos gêneros *Vibrio* (18%), *Aeromonas* (8%), *Bacillus* (4%) e *Shewanella* (4%), também predominaram.

Gráfico 4 – Diversidade total (%) das bactérias produtoras de histamina identificadas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os membros do gênero *Pseudomonas* são bastonetes, Gram negativos, que representam um grupo bacteriano comumente encontrado em peixes e reconhecidos como um dos principais responsáveis pela deterioração do pescado (FERNÁNDEZ-NO *et al.*, 2011; JAY, 2005; RANI; CHELLADURAI; JAYANTHI, 2016). Existem muitos relatos quanto a presença e abundância de *Pseudomonas* spp. em pescados, como bactérias produtoras de histamina. No trabalho realizado por Hu, Huang e Chen (2014), sobre espécies bacterianas produtoras de histamina isoladas de *Decapterus maruadsi*, a 28 °C, os produtores de histamina mais frequentemente identificados pertenciam ao gênero *Pseudomonas*.

Pseudomonas spp. proliferaram e foram o grupo predominante em peixes armazenados a 15 °C, 4 °C e 0 °C, de acordo com trabalho realizado por Jiang *et al.* (2013), com o objetivo de correlacionar a variação do teor de histamina e o crescimento bacteriano em *Pneumatophorus japonicus*, em várias condições de armazenamento e identificar as espécies bacterianas produtoras de histamina. Segundo os autores, a produção de histamina durante o armazenamento a 0 e 4 °C correspondeu ao crescimento de *Pseudomonas* spp., sendo a histamina ainda produzida durante o armazenamento a 0 °C em um nível superior a 50 mg/kg no dia 8 de armazenamento.

Fernández-No *et al.* (2011), relataram que cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de *Pagellus bogaraveo* e *Psetta máxima* foram produtoras de histamina mais potentes do que uma das principais bactérias formadoras de histamina (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048), usada como controle positivo, produzindo níveis superiores a 170 ppm e 270 ppm para *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas fragi*, respectivamente.

Com relação a diversidade das bactérias produtoras de histamina, em cada um dos meses de coletas, pode-se verificar, por meio do Gráfico 5, que as bactérias do gênero *Pseudomonas* prevaleceram nos meses de coleta de maio, junho e julho.

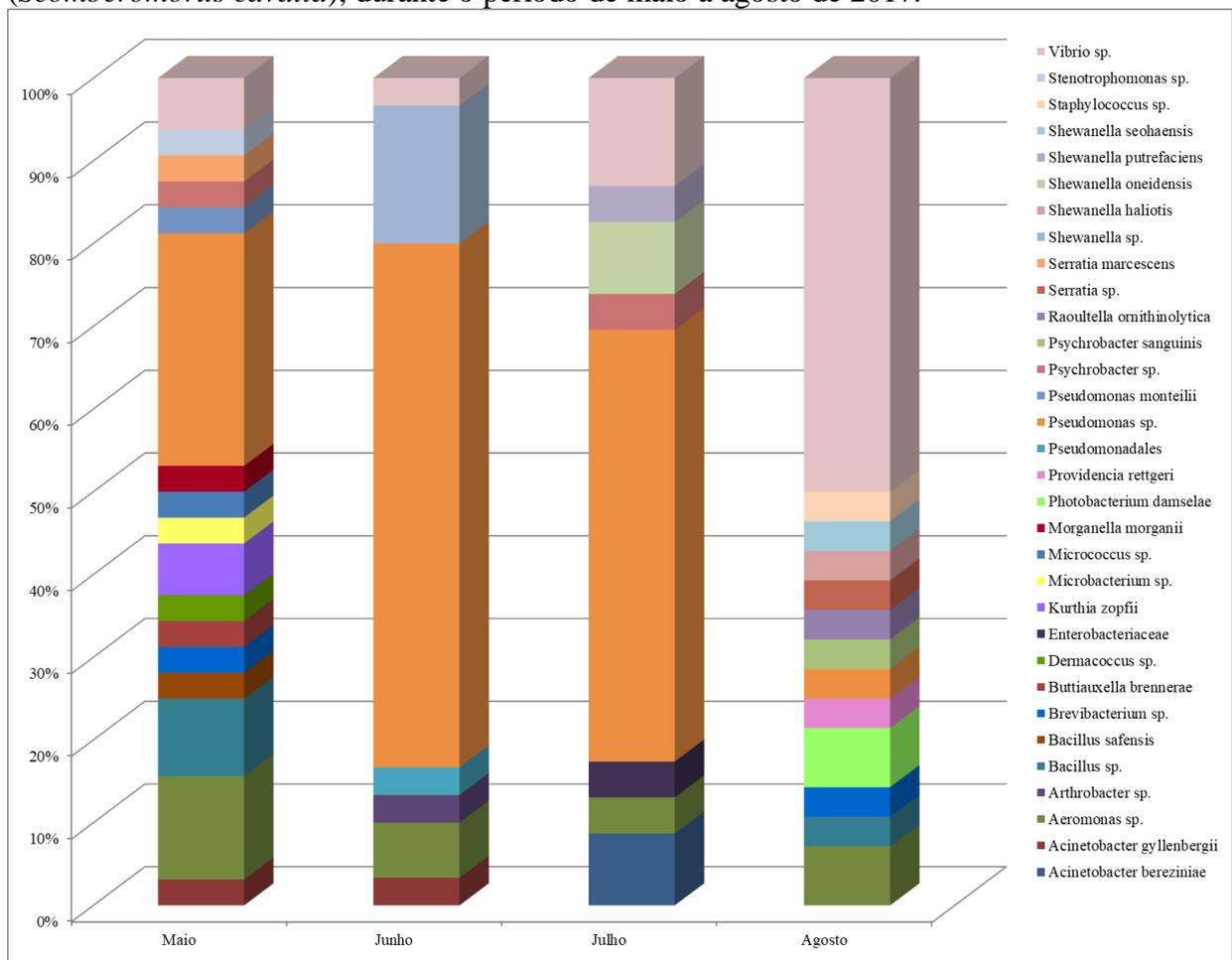
Já na coleta realizada no mês de agosto, o gênero *Pseudomonas* não apresentou grande expressividade, sendo as bactérias do gênero *Vibrio* as produtoras de histamina mais predominantes.

Bactérias do gênero *Vibrio* apresentam variações sazonais na água do mar, sendo a temperatura da água e a salinidade fortes determinantes, com maiores contagens durante os meses com temperatura da água mais quente (TURNER *et al.*, 2009). A relação direta entre as espécies de *Vibrio* e a temperatura da água do mar determina variações sazonais e geográficas na distribuição bacteriana, como tem sido observado nos Estados Unidos, Ásia e Europa. Nessas regiões os membros do gênero *Vibrio* podem ser rapidamente cultivados e detectados a partir de pescados marinhos e água do mar no período do verão, porém eles são encontrados

em quantidades escassas no inverno, quando a temperatura da água diminui (HEIDELBERG; HEIDELBERG; COLWELL, 2002; IGBINOSA; OKOH, 2008).

Esse fator corrobora com o fato de que no Estado do Ceará, o mês de agosto marca o início da estação seca ou período de estio, na maior parte da região (GUEDES *et al.*, 2005; MARENGO *et al.*, 2011). Segundo estudo realizado por Rabelo (2017), sobre a abundância e diversidade de bactérias cultiváveis componentes da microcamada superficial oceânica e bioaerossóis na costa de Fortaleza e os fatores que os influenciam, os teores mais altos de salinidade foram observados no período de estio, comparado ao período chuvoso, reforçando, portanto, a sazonalidade das chuvas como importante fator de influência da diversidade de bactérias no mar.

Gráfico 5 – Diversidade de bactérias produtoras de histamina isoladas da cavala (*Scomberomorus cavalla*), durante o período de maio a agosto de 2017.



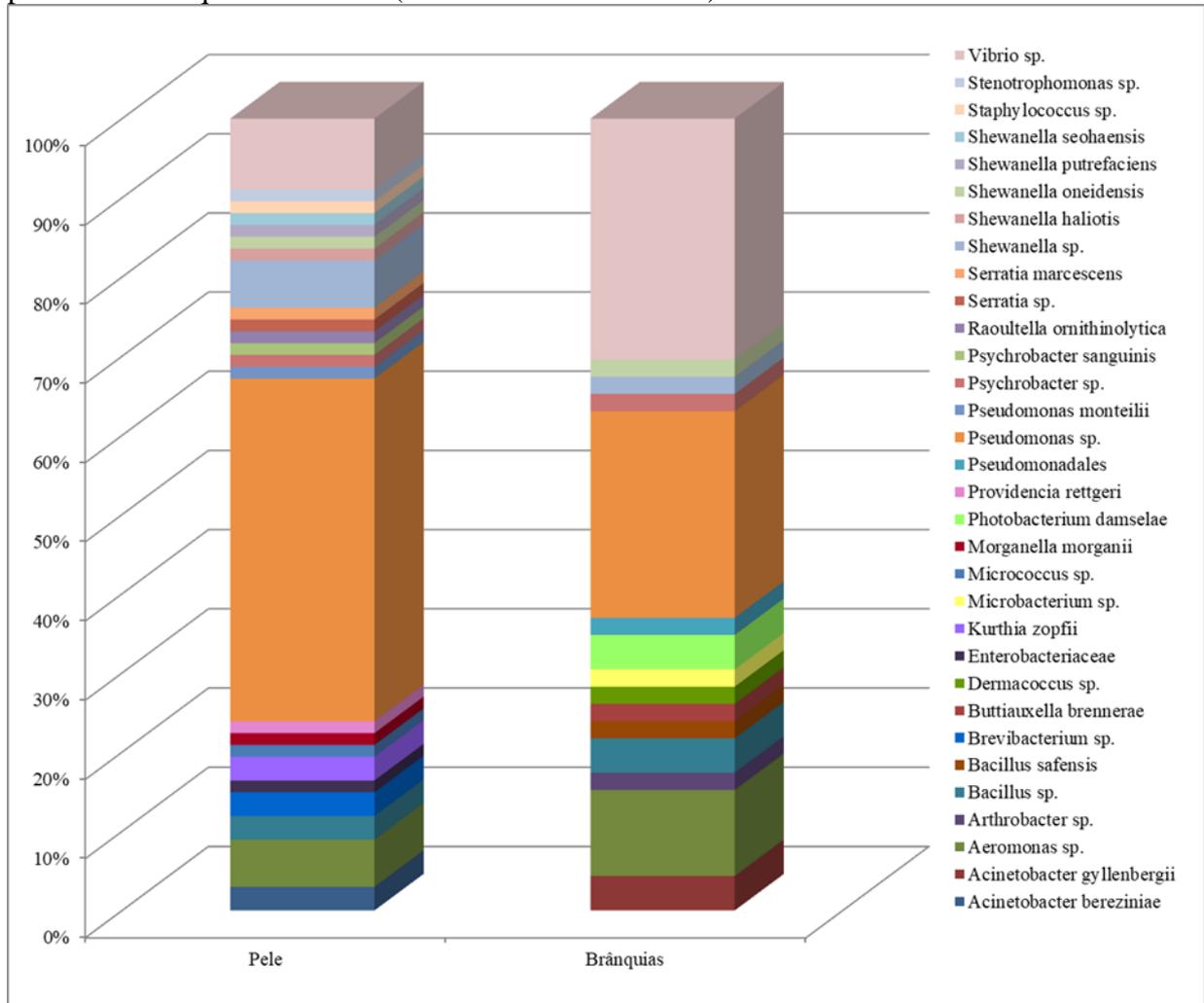
Várias espécies do gênero *Vibrio* foram isoladas a 30 °C e 15 °C, em estudo realizado por Torido *et al.* (2014), sobre a identificação de produtores de histamina mesofílicos e psicofílicos de uma ampla gama de amostras de peixes.

Foram identificadas como formadoras de histamina, cepas de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*, isoladas das guelras de espécimes de cavalas do Pacífico (*Scomber japonicus*) frescas, em estudo realizado por Kim *et al.* (2001b). Neste estudo, cepas de *Vibrio alginolyticus* foram isoladas durante armazenamento a 25 °C e 4 °C, mostrando características psicrotróficas.

O mês de coleta com maior diversidade de produtoras de histamina foi maio, o qual apresentou 15 dos 21 gêneros identificados. A coleta de maio também foi a que apresentou maior número e diversidade de bactérias Gram positivas, com bactérias do gênero *Bacillus*, incluindo um isolado da espécie *Bacillus safensis*, isolados da espécie *Kurthia zopfii* e dos gêneros *Brevibacterium*, *Dermacoccus*, *Microbacterium* e *Micrococcus* (GRÁFICO 5), sendo, de acordo com Rabelo (2017), o regime de chuvas fator determinante para essa abundância, devido a ampliação da descarga continental.

A diversidade de bactérias produtoras de histamina do muco superficial da pele da cavala foi superior a diversidade das brânquias (GRÁFICO 6), o que corrobora com estudo realizado por Singh *et al.* (2012), que investigaram a ocorrência de bactérias produtoras de histamina em peixes marinhos tropicais vendidos em Trinidad (Índias Ocidentais). Segundo os autores, as peles dos peixes apresentaram maior número de diferentes tipos de bactérias produtoras de histamina (nove), seguido das brânquias (sete).

Gráfico 6 – Diversidade de bactérias produtoras de histamina isoladas do muco superficial da pele e das brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*).



Larsen *et al.* (2013), em estudo sobre a caracterização e comparação da microbiota da pele de vários peixes teleósteos do centro-norte do Golfo do México, aplicando métodos independentes de cultura, concluíram que a microbiota específica da pele está associada à espécie do peixe, sendo a composição e estrutura da microbiota impactada por diversas variáveis, incluindo fatores abióticos ligados à localização geográfica e estação do ano, bem como, fatores bióticos relacionados ao potencial de nutrientes ou componentes antimicrobianos do muco dos peixes. Portanto, os táxons bacterianos associados às superfícies externas dos peixes são influenciados pela espécie e as superfícies são colonizadas por uma microbiota que se distingue de acordo com as espécies de peixes.

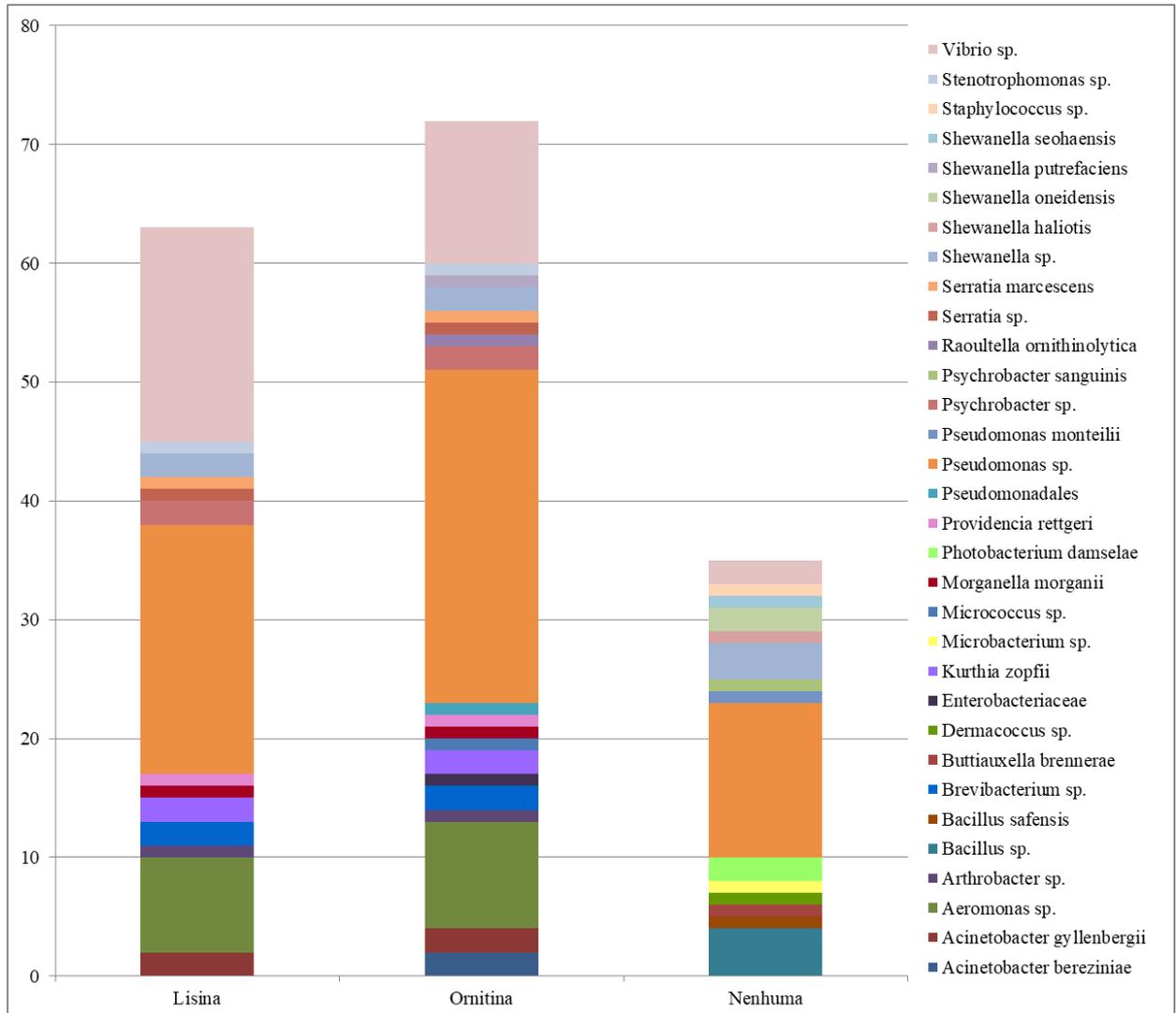
As bactérias do gênero *Pseudomonas* foram as BPH que mais prevaleceram no muco superficial da pele da cavala (GRÁFICO 6). De acordo com Larsen *et al.* (2013), *Pseudomonas* spp. são os principais componentes da microbiota da pele de peixes teleósteos.

4.3 Produção de outras aminas biogênicas

As aminas putrescina e cadaverina são consideradas por muitos autores como potencializadoras do efeito tóxico da histamina, por inibirem as enzimas DAO (diaminoxidases) e assim impedirem a desintoxicação. Por isso, a importância de avaliar além da capacidade dos microrganismos em produzir histamina, a capacidade de produzirem putrescina e cadaverina, já que a ingestão simultânea dessas outras aminas agrava a intoxicação alimentar causada pela histamina (BRINK *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994; SILLA-SANTOS, 1996; TAYLOR, 1985).

No Gráfico 7 estão apresentadas as estirpes produtoras de histamina com resultado positivo para a descarboxilação de lisina e/ou ornitina. Dos 113 isolados identificados, 57 (50,44%) apresentaram resultado positivo para descarboxilação tanto de lisina, como de ornitina, 6 (5,32%) resultado positivo para descarboxilação somente de lisina e 15 (13,27%) somente para ornitina. Apenas 35 (30,97%) não apresentaram resultado positivo para descarboxilação dos aminoácidos testados.

Gráfico 7 – Capacidade de descarboxilação de lisina e ornitina pelos isolados produtores de histamina.



Fonte: Elaborado pela autora.

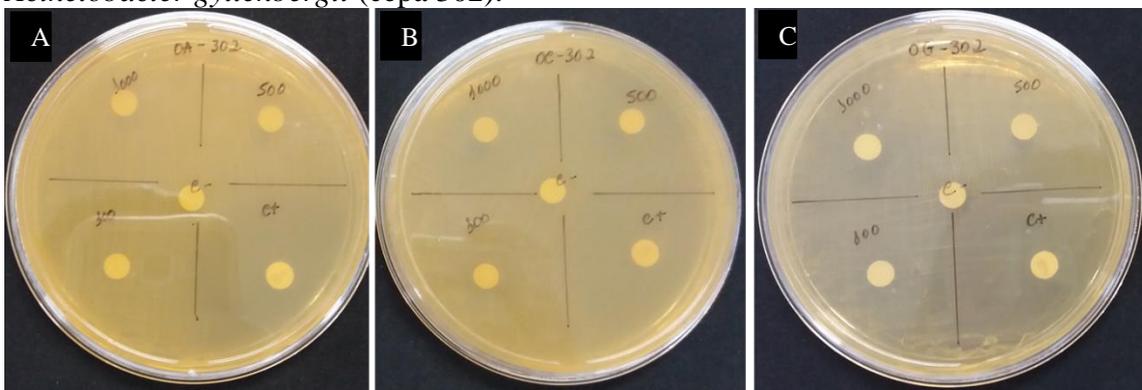
O fato de a maioria das bactérias que produzem histamina também possuírem a capacidade de produzirem outras aminas biogênicas (GRÁFICO 7), explica, de acordo com Feng, Teuber e Gershwin (2016), porque alguns casos de intoxicação por histamina ocorreram mesmo quando os níveis de histamina no peixe eram baixos.

Das 78 cepas que apresentaram resultado positivo para a descarboxilação de lisina e/ou ornitina, foram selecionadas 20 cepas para a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, utilizando como critérios de seleção: menor tempo para o desenvolvimento de coloração roxa intensa, em tubos com o meio diferencial para BPH, como resultado da alcalinização do meio pela presença de histamina (FIGURA 7) e a capacidade das cepas em produzirem outras aminas biogênicas (putrescina e cadaverina).

4.4 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente às bactérias produtoras de histamina selecionadas

Das 20 cepas avaliadas quanto à susceptibilidade a ação de óleos essenciais como antimicrobianos, apenas *Acinetobacter gyllenbergii* não sofreu inibição do crescimento por nenhum óleo essencial, nem pelo antibiótico Cloranfenicol, utilizado como controle positivo (FIGURA 10).

Figura 10 – Resultado da análise de concentração inibitória mínima para *Acinetobacter gyllenbergii* (cepa 302).



Fonte: Própria autora.

A: resultado da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim em três concentrações diferentes; B: resultado da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo em três concentrações diferentes; C: resultado da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre em três concentrações diferentes.

Acinetobacter spp. são frequentemente isoladas de peixes saudáveis ou doentes como componentes da microbiota marinha. Porém, muitos membros do gênero *Acinetobacter* possuem a capacidade de resistir a quase todos os agentes antimicrobianos disponíveis (KOZIŃSKA *et al.*, 2014). Carvalheira *et al.* (2017), em estudo sobre a diversidade de *Acinetobacter* spp. em amostras de carne e a resistência dessas a antibióticos, isolou estirpes de *Acinetobacter gyllenbergii* resistentes a várias classes de antibióticos, como penicilinas (piperacilina e piperacilina-tazobactama), polimixinas (polimixina B e colistina), tetraciclina (minociclina) e fluorquinolona (ciprofloxacina).

De acordo com alguns autores, as bactérias Gram negativas são geralmente menos suscetíveis a ação dos óleos essenciais, que as bactérias Gram positivas, devido a membrana externa das bactérias Gram negativas restringir a difusão de compostos hidrofóbicos através da camada de lipopolissacarídeos presentes na membrana, a qual cria uma barreira contra macromoléculas e compostos hidrofóbicos, fornecendo às bactérias Gram negativas maior tolerância a compostos antimicrobianos hidrofóbicos como aqueles encontrados em óleos

essenciais (HASSOUN; ÇOBAN, 2017; NIKAIDO, 2003; RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2015; TROMBETTA *et al.*, 2005). Contudo, o óleo essencial de cravo inibiu o crescimento de 19 das 20 cepas testadas (TABELA 4), sendo eficiente tanto contra bactérias Gram positivas, quanto contra Gram negativas.

Tabela 4 – Resultado da atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo frente às BPH selecionadas.

Cepa	Média ± Desvio Padrão (mm) dos halos de inibição				
	1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$	500 $\mu\text{L mL}^{-1}$	100 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Controle positivo Cloranfenicol	
91	<i>Serratia marcescens</i>	8,23±0,01	8,07±0	-	14,76±0,09
93	<i>Aeromonas</i> spp.	22,26±0,92	20,52±0,51	6,84±0,28	23,43±3,08
105	<i>Psychrobacter</i> spp.	32,59±0,31	26,93±3,21	7,71±0,55	30,81±0,04
109	<i>Pseudomonas</i> spp.	6,95±0,23	-	-	16,02±0,01
114	<i>Morganella morganii</i>	13,65±2,17	9,90±0,01	-	7,75±0,47
250	<i>Pseudomonas</i> spp.	6,61±0,01	6,66±0,04	-	-
252	<i>Pseudomonas</i> spp.	8,78±0,45	8,12±0,34	6,59±0,41	RC*
270	<i>Shewanella</i> spp.	30,69±1,35	24,81±1,68	8,68±0,80	39,34±2,35
297	<i>Arthrobacter</i> spp.	21,34±5,30	25,16±0,88	7,33±0,00	12,10±0,01
404	<i>Pseudomonas</i> spp.	14,48±0,74	9,21±1,41	-	12,97±3,49
414	<i>Pseudomonas</i> spp.	18,17±0	17,30±1,47	6,95±0,04	27,17±1,47
417	<i>Pseudomonas</i> spp.	9,64±0,23	8,06±0,59	-	14,77±2,62
419	Enterobacteriaceae	10,00±0,23	7,79±0,37	6,16±0,01	18,10±0,96
424	<i>Shewanella putrefaciens</i>	17,89±0,90	15,15±0,82	6,35±0,16	28,91±0,83
434	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	17,55±0,86	16,74±0,01	-	7,72±0
451	<i>Pseudomonas</i> spp.	10,46±2,12	9,03±0	-	8,82±0,01
453	<i>Pseudomonas</i> spp.	11,80±0,98	10,65±0,73	7,00±0,93	8,09±0,87
464	<i>Psychrobacter</i> spp.	34,66±1,03	30,18±0,54	7,29±0,31	31,86±0,86
619	<i>Vibrio</i> spp.	15,96±0,76	15,42±0	-	27,04±0,79

Fonte: Própria autora.

*RC: redução de carga microbiana.

Duas cepas de *Pseudomonas* spp. (250 e 252) mostraram-se resistentes ao Cloranfenicol, já que o mesmo não inibiu o crescimento da cepa 250 e da 252 ocasionou apenas uma redução de carga. Porém, ambas as estirpes foram sensíveis ao óleo essencial de cravo, com halos de inibição de 6,66 mm na concentração de 500 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (concentração

mínima de inibição) para a estirpe 250 e de 6,59 mm na concentração de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para a estirpe 252 (TABELA 4).

O óleo essencial de gengibre também apresentou atividade antimicrobiana de amplo espectro, inibindo o crescimento de cepas Gram negativas e Gram positivas. Porém, somente houve inibição do crescimento de 9 das 20 cepas testadas (TABELA 5).

Tabela 5 – Resultado da atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre frente às BPH selecionadas.

Cepa	Média \pm Desvio Padrão (mm) dos halos de inibição			
	1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$	500 $\mu\text{L mL}^{-1}$	100 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Controle positivo Cloranfenicol
105 <i>Psychrobacter</i> sp.	7,02 \pm 0,10	-	-	32,58 \pm 1,64
270 <i>Shewanella</i> sp.	7,57 \pm 0	7,57 \pm 0	-	38,32 \pm 0,46
297 <i>Arthrobacter</i> sp.	17,35 \pm 0,50	14,66 \pm 0,01	8,66 \pm 0,08	23,19 \pm 1,40
404 <i>Pseudomonas</i> sp.	7,96 \pm 0,32	7,26 \pm 0,01	-	25,77 \pm 6,34
414 <i>Pseudomonas</i> sp.	7,70 \pm 0,57	7,70 \pm 0,01	6,73 \pm 0,01	28,31 \pm 0,01
424 <i>Shewanella putrefaciens</i>	7,01 \pm 0	7,95 \pm 0,17	-	32,68 \pm 4,82
453 <i>Pseudomonas</i> sp.	6,32 \pm 0	-	-	8,73 \pm 0,01
464 <i>Psychrobacter</i> sp.	6,90 \pm 0,26	7,08 \pm 0,01	-	28,08 \pm 2,60
619 <i>Vibrio</i> sp.	7,34 \pm 0,18	7,22 \pm 0,01	-	28,84 \pm 0,42

Fonte: Própria autora.

O óleo essencial de alecrim foi, dentre os três óleos testados, o que apresentou menor eficiência na inibição do crescimento das BPH identificadas e selecionadas, apresentando halos de inibição somente para 4 das 20 cepas testadas (TABELA 6).

Tabela 6 – Resultado da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim frente às BPH selecionadas.

Cepa	Média \pm Desvio Padrão (mm) dos halos de inibição			
	1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$	500 $\mu\text{L mL}^{-1}$	100 $\mu\text{L mL}^{-1}$	Controle positivo Cloranfenicol
105 <i>Psychrobacter</i> sp.	8,06 \pm 0,76	-	-	32,97 \pm 2,40
270 <i>Shewanella</i> sp.	8,89 \pm 0	7,04 \pm 0,47	-	37,37 \pm 0,52
434 <i>Acinetobacter bereziniae</i>	7,33 \pm 0,19	-	-	8,41 \pm 1,63
453 <i>Pseudomonas</i> sp.	6,62 \pm 0,01	-	-	9,87 \pm 0,73

Fonte: Própria autora.

Deste modo, dentre os óleos essenciais avaliados, o que apresentou melhor desempenho em termos de atividade antimicrobiana foi o óleo essencial de cravo, o qual promoveu a inibição de quase todas as cepas testadas, tanto Gram negativas, quanto Gram positivas, assim, considerado um antimicrobiano de amplo espectro, fator importante devido a grande diversidade de bactérias capazes de produzir histamina e outras amins biogênicas.

De acordo com Di Pasqua *et al.* (2007), o eugenol (principal constituinte químico do óleo essencial de cravo) é capaz de perturbar a membrana das células microbianas, permitindo o vazamento de componentes intracelulares, enquanto outros compostos bioativos de óleos essenciais causam apenas uma alteração estrutural na membrana.

Portanto, o uso do óleo essencial de cravo como ferramenta preventiva no controle da formação e acúmulo de histamina e outras aminas biogênicas pode apresentar-se como uma alternativa eficiente para garantir a qualidade e segurança em espécies de peixes susceptíveis à formação de histamina, como a cavala (*Scomberomorus cavalla*), através da inibição do crescimento de BPH (BJORNSDOTTIR-BUTLER *et al.*, 2015).

5 CONCLUSÃO

Esta pesquisa é uma contribuição ao conhecimento da diversidade de bactérias produtoras de histamina em pescado marinho de águas tropicais, visando o desenvolvimento de procedimentos e tecnologias que sejam eficazes para reduzir os riscos relacionados à ingestão de histamina, garantindo a segurança dos consumidores.

Foram quantificadas bactérias heterotróficas cultiváveis e bactérias produtoras de histamina (com resultado positivo em meio diferencial) em quantidades equivalentes, tanto no muco superficial da pele, como nas brânquias da cavala (*Scomberomorus cavalla*). Portanto, pode-se confirmar serem esses locais importantes na contaminação bacteriana do pescado.

Foi possível observar uma influência da época do ano no número e na diversidade das bactérias produtoras de histamina, ocorrendo provavelmente pela sazonalidade do regime de chuvas no Estado do Ceará.

Bactérias produtoras de histamina, tanto Gram negativas, quanto Gram positivas estão presentes na superfície da pele e nas brânquias da cavala, havendo, porém, uma predominância de bactérias Gram negativas, sendo as maiores representantes *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. e *Shewanella* spp.

Grande parte da microbiota produtora de histamina isolada foi capaz de produzir outras aminas biogênicas (putrescina e cadaverina), através da descarboxilação dos aminoácidos ornitina e lisina, respectivamente. Este fator é preocupante do ponto de vista toxicológico, já que essas aminas atuam como potencializadoras do efeito tóxico da histamina, podendo agravar os sintomas de intoxicação por histamina, causada pelo consumo de peixes.

O óleo essencial de cravo foi o mais eficiente como antimicrobiano contra as bactérias produtoras de histamina selecionadas, o qual foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram negativas e Gram positivas, portanto, comprovou-se ser de amplo espectro.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. S. *et al.* Atividade antioxidante e antimicrobiana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de tilápia (*Oreochromis* ssp.) salgados secos durante o armazenamento congelado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 12-17, 2008.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ARAÚJO, D. H. P. **Determinação de histamina e outras aminas bioativas e perfil de ácidos graxos de peixes da região amazônica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.
- ARIDOGAN, B. *et al.* Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, n. 6, p. 860-864, 2002.
- ASHIE, I. N. A.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 36, n. 182, p. 87-121, 1996.
- BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 117-122, 2008.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends of Food Science and Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BARDÓCZ, S. *et al.* Polyamines in food: implications for growth and health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 4, p. 66-71, 1993.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BJORNSDOTTIR-BUTLER, K. *et al.* Control of histamine-producing bacteria and histamine formation in fish muscle by trisodium phosphate. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 1253-1258, 2015.
- BJORNSDOTTIR-BUTLER, K. *et al.* Quantification of total and specific gram-negative histamine-producing bacteria species in fish using an MPN real-time PCR method. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1284-1292, 2011.

BJÖRNSDÓTTIR-BUTLER, K.; GREEN, D. P. Detection of histamine-producing bacteria in fish. **Global aquaculture advocate**, 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasil, 2011. 60 p. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2011_bol_bra.pdf>. Acesso em: 23 de dez. de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 185 de 13 de maio de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 de maio de 1997. Seção 1, p. 10282.

BRINK, B. *et al.* Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 73-84, 1990.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CAPONIO, F. *et al.* Chemical characteristics and lipid fraction quality of sardines (*Sardina pilchardus* W.): influence of sex and length. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, p. 530-535, 2004.

CARMO, F. B. T. *et al.* Histamina em conservas de sardinha. **Revista Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 174-180, 2010.

CARNEIRO, P. B. M.; SALLES, R. Caracterização da pescaria com rede de emalhar derivante realizada no município de Fortaleza, estado do Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 44, n. 1, p. 69-80, 2011.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHEIRA, A. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolated from meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 243, p. 58-63, 2017.

CE - CONFORMITÉ EUROPÉENNE. Directiva de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas aplicables a la produccion y puesta em el mercado de los produtos pesqueiros (91/439/EEC). **Diario Oficial de la Comunidad Europea**, v. 286, p. 15-34, 1991.

CINQUINA, A. L. *et al.* Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 73-77, 2004.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2010.

DAFERERA, D. *et al.* GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, 2000.

DELAQUIS, P. J. *et al.* Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101-109, 2002.

DI PASQUA, R. *et al.* Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agric. and Food Chem.**, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

DONSÌ, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

DOWNES, M. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **APHA**. 4 ed. Washington, DC, 2001.

ECONOMOU, V. *et al.* Microbial quality and histamine producing microflora analysis of the ice used for fish preservation. **Journal of Food Safety**, p. 1-8, 2016.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)**, 2011.

EL-MAATI, M. F. A. *et al.* Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8, p. 494-504, 2016.

EMBORG, J.; DALGAARD, P.; AHRENS, P. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine producing bacterium isolated from various seafoods. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2473-2479, 2006.

EVANGELISTA, W. P. **Prevalência de histamina em peixes escombrídeos e intoxicação histamínica no Brasil de 2007 a 2009**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiol. Rev.**, v. 85, p. 97-177, 2005.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products**. Meeting report. Rome, 2013.

FARIA, L. R. D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus***

officinalis L. (alecrim): atividade antiinflamatória e analgésica. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Unifenas, Alfenas, 2005.

FDA - Food and Drug Administration. Decomposition and histamine – raw frozen tuna and mahi-mahi; canned tuna; and related species; availability of revised compliance policy guide. **Federal Registration**, v. 149, p. 39754-39756, 1995.

FENG, C.; TEUBER, S.; GERSHWIN, M. E. Histamine (Scombroid) fish poisoning: a comprehensive review. **Clinic Rev. Allerg. Immunol.**, v. 50, p. 64-69, 2016.

FERNÁNDEZ-NO, I. C. *et al.*, Characterisation of histamine-producing bacteria from farmed blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) and turbot (*Psetta maxima*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 182-189, 2011.

FERRARIO, C. *et al.* PCR detection and identification of histamine-forming bacteria in filleted Tuna fish samples. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 2, p. 115-120, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FONTELES FILHO, A. A. Síntese sobre a distribuição, abundância, potencial pesqueiro e biologia da cavala *Scomberomorus cavalla* (Cuvier) e a Serra *Scomberomorus brasiliensi* Collete, Russo e Zavala - Camin da região Nordeste do Brasil. **Avaliação do Potencial Sustentável de Recursos Vivos na Zona Econômica Exclusiva MMA – REVIZEE**, 2000. 10 p.

GANDRA, E. A. *et al.* Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GILBERT, R. J. *et al.* Scombrototoxic fish poisoning: features of the first 50 incidents to be reported in Britain (1976–1979). **British Medical Journal**, v. 281, p. 70-73, 1980.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In: Hui, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. v. 4. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2005. Cap. 13, p. 1-38.

GLÓRIA, M. B. A. *et al.* Histamine and other biogenic amines in albacore tuna. **Journal of Aquatic Food Products and Technology**, v. 8, n. 4, p. 55-69, 1999.

GOMES, M. B. *et al.* O risco das amins biogênicas nos alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1123-1134, 2014.

GUEDES, R. L. *et al.* Série temporal de precipitação mensal de Fortaleza, Brasil: comparação entre observações e dados de reanálise do NCEP/NCAR. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 20, n. 1, p. 83-92, 2005.

GUO, N. *et al.* The preservative potential of *Amomum tsaoko* essential oil against *E. coil*, its antibacterial property and mode of action. **Food Control**, v. 75, p. 236-245, 2017.

HALÁSZ, A. *et al.* Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HASSOUN, A.; ÇOBAN, Ö. E. Essential oils for antimicrobial and antioxidante applications in fish and other seafood products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 26-36, 2017.

HEIDELBERG, J. F.; HEIDELBERG, K. B.; COLWELL, R. R. Bacteria of the γ -subclass Proteobacteria associated with zooplankton in chesapeake bay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5498-5507, 2002.

HUI, X. *et al.* Antimicrobial mechanism of the major active essential oil compounds and their structure-activity relationship. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, p. 442-449, 2017.

HU, Y.; HUANG, Z.; CHEN, X. Histamine-producing bacteria in blue scad (*Decapterus maruadsi*) and their abilities to produce histamine and other biogenic amines. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2213-2221, 2014.

HUNGERFORD, J. M. Scombroid poisoning: a review. **Toxicon**, v. 56, p. 231-243, 2010.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.

IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 495-506, 2008.

ISAAC, V. J.; ALMEIDA, M. C. El consumo de pescado en la Amazonía Brasileña. **COPESCAALC Documento Ocasional n° 13**. Roma, FAO, 2011. 54 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/014/i2408s/i2408s.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

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

JIANG, Q. *et al.* Histamine production and bacterial growth in mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) during storage. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, p. 246-253, 2013.

KANKI, M. *et al.* *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 79-87, 2004.

KIM, M.; MAH, J.; HWANG, H. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. **Food Chemistry**, v. 116, p. 87-95, 2009.

KIM, S. H. *et al.* Molecular detection of a histamine former, *Morganella morganii*, in albacore, mackerel, sardine, and a processing plant. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 453-457, 2003.

KIM, S. H. *et al.* Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1035-1044, 2001a.

KIM, S. H. *et al.* Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in Pacific Mackerel during storage. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 10, p. 1556-1564, 2001b.

KLEIN, V. L. M. Helminhos parasitos das espécies *Scomberomorus cavalla* (Cuvier) e *Scomberomorus maculatus* (Mitchill) do litoral cearense. *Contracecum fortalezae* sp. n. (Nematoda, Ascaridoidea). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 71, n. 1-2, p. 199-202, 1973.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, B. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465 p.

KOZIŃSKA, A. *et al.* *Acinetobacter johnsonii* and *Acinetobacter lwoffii* - the emerging fish pathogens. **Bull Vet. Inst. Pulawy**, v. 58, p. 193-199, 2014.

LANDETE, J. M. *et al.* Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 258-269, 2007.

LARSEN, A. *et al.* Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 85, p. 483-494, 2013.

LEAF, A. Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 20, p. 525-538, 2006.

LEE, Y. *et al.* Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. **Journal of food and drug analysis**, v. 23, p. 836-844, 2015.

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

LESSA, R. P. Recursos Pesqueiros da Região Nordeste. **Programa REVIZEE: Avaliação do potencial sustentável de recursos vivos na zona econômica exclusiva**. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Qualidade Ambiental, Brasília, DF, 2006. 280 p.

LESSA, R. P. *et al.* Dinâmica de populações e avaliação de estoques dos recursos pesqueiros da região Nordeste. **Programa REVIZEE: Avaliação do potencial sustentável de recursos vivos na zona econômica exclusiva**. Recife, 2004. 246 p.

LOMARAT, P. *et al.* Bioautography-guided isolation of antibacterial compounds of essential oils from Thai spices against histamine-producing bacteria. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 03, p. 473-477, 2013.

LOPEZ, I. *et al.* Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 11, p. 6801-6807, 2003.

LU, S. *et al.* The effects of starter cultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages. **Food Control**, v. 50, p. 869-875, 2015.

MACHADO, A. L. **Susceptibilidade a antimicrobianos e perfil de resistência plasmidial em cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado de água doce e salgada, comercializados em feiras de Fortaleza-CE.** 2015. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

MAGALHÃES, M. T. *et al.* Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 132-136, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611997000200013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 de jan. 2017.

MAH, J. H.; KIM, Y. J.; HWANG, H. J. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. **Food Control**, v. 20, p. 449-454, 2009.

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1185-1196, 2007.

MAJOLO, C. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 505-512, 2014.

MARENGO, J. A. *et al.* Variabilidade e mudanças climáticas no semiárido brasileiro. *In.*: **Recursos hídricos em regiões áridas e semiáridas**, p. 384-422, 2011.

MARTINS, A. G. L. A. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças.** 2010. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

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

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa.** 2004. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MENEZES, M. E. S. *et al.* Valor nutritivo de peixes da costa marítima de Alagoas, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 21-28, 2009.

NAILA, A. *et al.* Control of biogenic amines in food - existing and emerging approaches. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 139-150, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

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

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, v. 1, 1999. 430 p.

OLIVEIRA, H. A. C. *et al.* Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 179-188, 2004.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

POSTOLLEC, F. *et al.* Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, p. 848-861, 2011.

POTENCIAL BRASILEIRO. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**, [S.l.], 2014. Disponível em: < http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2016.

RABELO, J. S. **Abundância e diversidade bacteriana na microcamada superficial e bioaerossóis marinhos na orla oceânica de Fortaleza, Ceará**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Oceanografia) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

RANI, M. K.; CHELLADURAI, G.; JAYANTHI, G. Isolation and identification of bactéria from marine market fish *Scomberomorus guttatus* (Bloch and Schneider, 1801) from Madurai district, Tamil Nadu, India. **Journal Parasit. Dis.**, v. 40, n. 3, p. 1062-1065, 2016.

RIBEIRO, D. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos *in vitro* e em matriz alimentícia**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RODRIGUEZ-GARCIA, B. A. *et al.* Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1717-1727, 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, J. C. **Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliensis*)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5 ed. São Paulo: Santos, 2013. 611 p.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008.

SHAKILA, R. J.; VASUNDHARA, T. S.; RAO, D. V. Inhibitory effect of spices on in vitro histamine production and histidine decarboxylase activity of *Morganella morganii* and on the biogenic amine formation in mackerel stored at 30 °C. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 203, p. 71-76, 1996.

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

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 213-231, 1996.

SILVA, T. M. *et al.* Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. **Food Control**, v. 22, p. 323-327, 2011.

SILVA, T. M. **Otimização e validação de método para determinação de histamina em pescado**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. *In*: Azevedo, M. O. *et al.* **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. Cap. 6, p. 99-110.

SILVEIRA, N. F. A. **Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre**. 2002. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

SINGH, M. *et al.* A prevalence study of histamine and histamine producing bacteria in two commercial tropical marine fish sold in Trinidad, West Indies. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 2, 2012.

SINGH, G. *et al.* Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3295-3302, 2008.

SIQUI, A. C. *et al.* Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

- SMITH, T. A. Amines in food. **Food Chemistry**, v. 6, p. 169-200, 1980-81.
- SOUZA, A. L. M. *et al.* Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 82, p. 1-11, 2015.
- SOUZA, E. L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare L.*): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. 2006. Tese (Doutorado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- SOUZA, M. **Comparação de técnicas moleculares para identificação das espécies de *Fusarium* de amostras clínicas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.
- TAYLOR, S. L. **Histamine poisoning associated with fish, cheese, and other foods**. World Health Organization, Geneva, p. 1-45, 1985.
- TAYLOR, S. L. *et al.* Histamine production by food-borne bacterial species. **Journal of Food Safety**, v. 1, p. 173-187, 1978.
- TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB, V. Antibacterial effect of essential oil compounds and nisin to food spoilage bacteria. **Kasetsart Journal**. v. 41, n. 5, p. 319-323, 2007.
- TORIDO, Y. *et al.* Distribution of psychrophilic and mesophilic histamine-producing bacteria in retailed fish in Japan. **Food Control**, v. 46, p. 338-342, 2014.
- TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 894 p.
- TRAJANO, V. N. *et al.* Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 542-545, 2009.
- TROMBETTA, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.
- TURINA, A. V. *et al.* Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p. 101-113, 2006.
- TURNER, J. W. *et al.* Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. **The ISME Journal**, v. 3, p. 1082-1092, 2009.
- VECIANA-NOGUÉS, M. C.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2036-2041, 1997.
- VIEIRA, O. G. A. **Caracterização dos microrganismos e quantificação de toxinas bacterianas no músculo de peixes pelágicos utilizados no consumo humano na Ilha da Madeira**. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protein and aminoacid requirements in human nutrition**. Report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation, United Nations University. Technical Report Series, 2007. 935 p.

ZANCAN, K. C. **Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes: um estudo da atividade biológica dos extratos**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

ZOTOU, A. *et al.* Determination of biogenic amines in wines and beers by high performance liquid chromatography with pre-column dansylation and ultraviolet detection. **Chromatographia**, v. 57, p. 429-439, 2003.

**APÊNDICE A – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA AS
CONTAGENS DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS CULTIVÁVEIS (BHC) E
BACTÉRIAS PRODUTORAS DE HISTAMINA (BPH) DURANTE O PERÍODO DE
COLETAS**

Tabela de Análise de Variância para as quantificações da pele durante o período de coletas.

FV¹	GL²	SQ³	QM⁴	Fc⁵	Pr>Fc⁶
Bactérias	2	2,155279	1,077640	5,321	0,0095*
Coletas	3	0,243950	0,081317	0,402	0,7527ns
Bactérias*Coletas	6	0,517387	0,086231	0,426	0,8569ns
Erro	36	7,291150	0,202532		
Total corrigido	47	10,207767			
CV ⁷ (%)	10,12				
Média geral	4,45				
Número de observações	48				

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; * = significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

¹FV = Fonte de variação; ²GL = Graus de liberdade; ³SQ = Soma dos quadrados; ⁴QM = Quadrado médio; ⁵Fc = F calculado; ⁶Pr>Fc = Probabilidade de significância do teste F; ⁷CV = Coeficiente de variação.

Tabela de Análise de Variância para as quantificações das brânquias durante o período de coletas.

FV¹	GL²	SQ³	QM⁴	Fc⁵	Pr>Fc⁶
Bactérias	2	12,927829	6,463915	12,628	0,0001*
Coletas	3	17,937758	5,979253	11,681	0,0000*
Bactérias*Coletas	6	4,380854	0,730142	1,426	0,2316ns
Erro	36	18,427350	0,511871		
Total corrigido	47	53,673792			
CV ⁷ (%)	11,58				
Média geral	6,18				
Número de observações	48				

ns = não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; * = significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

¹FV = Fonte de variação; ²GL = Graus de liberdade; ³SQ = Soma dos quadrados; ⁴QM = Quadrado médio; ⁵Fc = F calculado; ⁶Pr>Fc = Probabilidade de significância do teste F; ⁷CV = Coeficiente de variação.

APÊNDICE B – IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS PRODUTORAS DE HISTAMINA ISOLADAS DO MUCO SUPERFICIAL DA PELE E DAS BRÂNQUIAS DA CAVALA (*Scomberomorus cavalla*)

Cepa	Identificação	Índice de identificação (%)
83	<i>Bacillus</i> spp.	100
84	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
88	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100
89	<i>Vibrio</i> spp.	96
91	<i>Serratia marcescens</i>	100
92	<i>Vibrio</i> spp.	99
93	<i>Aeromonas</i> spp.	100
95	<i>Kurthia zopfii</i>	100
103	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
105	<i>Psychrobacter</i> spp.	99
109	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
111	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	100
114	<i>Morganella morganii</i>	99
116	<i>Kurthia zopfii</i>	100
118	<i>Brevibacterium</i> spp.	85
131	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
147	<i>Bacillus</i> spp.	100
150	<i>Buttiauxella brennerae</i>	100
151	<i>Aeromonas</i> spp.	100
152	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	100
154	<i>Dermaococcus</i> spp.	100
155	<i>Aeromonas</i> spp.	100
156	<i>Microbacterium</i> spp.	100
157	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
158	<i>Bacillus safensis</i>	100
159	<i>Aeromonas</i> spp.	100
160	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
243	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
244	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
245	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
248	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
250	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
252	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
253	<i>Pseudomonas</i> spp.	90
255	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
256	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
258	<i>Shewanella</i> spp.	100
259	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
264	<i>Aeromonas</i> spp.	100
267	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
268	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
269	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
270	<i>Shewanella</i> spp.	99

Cepa	Identificação	Índice de identificação (%)
272	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
273	<i>Aeromonas</i> spp.	100
274	<i>Shewanella</i> spp.	100
276	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
278	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
280	<i>Shewanella</i> spp.	93
287	<i>Vibrio</i> spp.	100
288	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
291	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
297	<i>Arthrobacter</i> spp.	100
298	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
302	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	92
310	Pseudomonadales (ordem)	90
319	<i>Shewanella</i> spp.	99
403	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
404	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
406	<i>Aeromonas</i> spp.	100
414	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
417	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
419	Enterobacteriaceae (família)	99
421	<i>Vibrio</i> spp.	99
423	<i>Vibrio</i> spp.	100
424	<i>Shewanella putrefaciens</i>	98
429	<i>Shewanella oneidensis</i>	99
431	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	100
433	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
434	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	100
435	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
439	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
450	<i>Pseudomonas</i> spp.	99
451	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
453	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
454	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
456	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
464	<i>Psychrobacter</i> spp.	99
465	<i>Shewanella oneidensis</i>	100
470	<i>Vibrio</i> spp.	100
565	<i>Shewanella seohaensis</i>	99
574	<i>Shewanella haliotis</i>	98
575	<i>Staphylococcus</i> spp.	99
576	<i>Brevibacterium</i> spp.	100
577	<i>Providencia rettgeri</i>	100
589	<i>Vibrio</i> spp.	100
591	<i>Serratia</i> spp.	99
593	<i>Bacillus</i> spp.	100
146A	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
141B	<i>Bacillus</i> spp.	100
96B	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
96A	<i>Pseudomonas</i> spp.	100

Cepa	Identificação	Índice de identificação (%)
119A	<i>Micrococcus</i> spp.	90
573	<i>Vibrio</i> spp.	100
579	<i>Psychrobacter sanguinis</i>	97
595	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	100
600	<i>Pseudomonas</i> spp.	100
617	<i>Vibrio</i> spp.	100
606	<i>Vibrio</i> spp.	100
608	<i>Vibrio</i> spp.	99
611	<i>Photobacterium damsela</i>	100
614	<i>Vibrio</i> spp.	100
615	<i>Vibrio</i> spp.	99
616	<i>Vibrio</i> spp.	100
619	<i>Vibrio</i> spp.	99
622	<i>Vibrio</i> spp.	99
624	<i>Aeromonas</i> spp.	100
629	<i>Vibrio</i> spp.	100
630	<i>Vibrio</i> spp.	100
631	<i>Photobacterium damsela</i>	100
632	<i>Vibrio</i> spp.	99
636	<i>Aeromonas</i> spp.	100
638	<i>Vibrio</i> spp.	99