

Determinação da microbiota histamina positiva em camarão

Histamine - positive microbiota occurrence in shrimp

RIALA6/1150

Carine de Sousa ANDRADE¹, Janice Izabel DRUZIAN², Clícia Capibaribe LEITE², Celso Duarte CARVALHO FILHO², Maria da P. Spinola MIRANDA², Cláudia Souza MACÊDO³, Alaíse Gil GUIMARÃES^{2*}

*Endereço para correspondência: Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, CEP: 40170-115, Salvador, BA/Brasil, e-mail: alaise@ufba.br, tel (55)71 3283-6935.

¹ Bolsista PIBIC/CNPq

² Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador, BA/Brasil.

³ Departamento de Tecnologia, Departamento de Tecnologia, Colegiado de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA/Brasil.

Recebido: 30/10/2007 – Aceito para publicação: 10/03/2008

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar quantitativamente a microbiota total e as bactérias produtoras de histamina em camarões de cativeiro e de captura oriundos do comércio de Salvador-BA. Foram coletadas 40 amostras, sendo 20 de camarões provenientes de cativeiro e 20 de captura. As contagens de microrganismos mesófilos e psicotróficos e de bactérias presumivelmente histamina-positivas foram realizada em ágar Niven, seguida de procedimento de confirmação da capacidade de produção de histamina e de identificação das respectivas bactérias. As amostras de camarão de cativeiro apresentaram valor máximo de 3,74 log UFC/g para bactérias mesófilas e de 3,51 log UFC/g para psicotróficas, os quais estavam abaixo dos limites máximos estabelecidos nas especificações de qualidade de pescado (7,0 log UFC/g). Nas amostras de camarão de captura os valores máximos foram de 7,81 log UFC/g para mesófilas e de 7,49 log UFC/g para psicotróficas; esses valores excederam o limite máximo estabelecido pelos padrões, indicando elevada contaminação. Do total de amostras, 08 confirmaram a presença de bactérias produtoras de histamina (06 mesófilas e 02 psicotróficas), sendo a maioria dos microrganismos pertencente à família Enterobacteriaceae. Portanto, a presença desses microrganismos indica a ocorrência de condições higiênicas sanitárias e de temperatura insatisfatórias na comercialização de pescados.

Palavras-chave. histamina, camarão, bactérias

ABSTRACT

This study was conducted with the objective of quantitatively assessing the total microbial count and the histamine producing-bacteria in caught shrimps and in aquaculture-bred shrimps, which were sold in Salvador-Bahia. Forty samples were collected, being 50% of caught shrimps and the other twenty from aquaculture. For performing mesophilic and psychotropic microorganisms counts the Niven agar was employed. Aquaculture shrimp samples presented a maximum value of 3.74 log CFU/g of mesophilic bacteria and 3.51 log CFU/g of psychotropic microorganisms, which were below the maximum limits values established for fish quality specifications criteria. In caught shrimp samples the maximum values were 7.81 log CFU/g of mesophilic bacteria and 7.49 log CFU/g of psychotropic bacteria. Both values exceeded the maximum limit established by legislation, and these findings indicated a high rate of bacteria contamination. Histamine producing - bacteria were found in eight samples, and the most of these microorganisms belonged to Enterobacteriaceae family, which indicated the occurrence of the undesirable conditions of hygiene and temperature in shrimp trading.

Key words. histamine, shrimp, bacteria

INTRODUÇÃO

A produção e comercialização de camarão estão se expandindo em diversos países e se tornando uma das atividades mais importantes do setor pesqueiro¹. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO)², no ano de 2005, a produção mundial de camarão chegou a 6 milhões de t, sendo que a captura, proveniente do extrativismo, foi de aproximadamente 3,42 milhões de t. Em 2005 o Brasil foi o 6º exportador mundial deste crustáceo e nos três últimos anos representou cerca de 52,5% do total das exportações de pescado³.

O camarão é um produto altamente perecível devido ao seu conteúdo em proteínas, compostos nitrogenados não protéicos, aminoácidos livres e elevada atividade de água. Por ser rico em proteínas é suscetível a ação autolítica das enzimas proteolíticas musculares e/ou a deterioração microbiana^{4,5}. As enzimas proteolíticas presentes no suco gástrico e nos tecidos provocam a decomposição, propiciando a disseminação de microrganismos endógenos⁶. Além da microbiota normal, os microrganismos contaminantes podem ser incorporados durante a captura e, principalmente, na sua manipulação^{7,8}.

Os fatores intrínsecos relacionados a este produto, juntamente com a falta de condições higiênicas que vão desde a captura até o beneficiamento, somados a temperaturas inadequadas durante armazenamento, transporte e comercialização são fatores que favorecem sua deterioração^{6,7}. Além das perdas econômicas do alimento, o desenvolvimento microbiano poderá levar a produção de amins biogênicas, a exemplo, da histamina, tornando o alimento impróprio para consumo⁹.

A intoxicação alimentar por histamina é conhecida como “intoxicação escombróide”, tem sido observada após o consumo de pescado com altos teores desta amina^{10,11,12,13}. A produção de histamina é devida principalmente a um processo de descarboxilação de histidina livre pela ação da enzima exógena histidina descarboxilase^{14,15}. No entanto, é essencial destacar que o processo de descarboxilação da histidina se deve à atividade de várias espécies bacterianas presentes nos pescados, uma vez que esta enzima não está presente naturalmente nos tecidos dos mesmos^{10,14,15,16}. Verifica-se ainda, que pescado contendo níveis expressivos de histamina nem sempre evidenciam sinais aparentes de deterioração, porém seu efeito tóxico, pode causar danos à saúde do consumidor^{12,17}. Deste modo, o teor de histamina é considerado um parâmetro ou índice de qualidade de alimentos, pois infere as condições higiênicas-sanitárias dos produtos marinhos^{13,17}.

A ingestão de alimentos com níveis de histamina em concentrações acima de 100mg/100 g de alimento conferem risco à saúde pública^{17,18,19}. As propriedades psicoativas e vasoativas de algumas amins biogênicas, especialmente histamina, provocam efeitos tóxicos e farmacológicos²⁰. O processo patológico da intoxicação por histamina caracteriza-se por um período curto de incubação e duração. Os sintomas mais

freqüentes são os cardiovasculares, principalmente palpitações, urticárias, eritemas na face e região do pescoço, disfagia, podendo ocorrer choque anafilático; os gastrointestinais, que incluem dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia e os neurológicos com dores e inchaços relacionados as urticárias e formigamento na língua^{12,19,21}.

Observa-se que a maioria dos estudos referentes à ocorrência de histamina em camarão relata espécies de bactérias mesófilas e psicrotróficas^{22,23}. Bactérias da família Enterobacteriaceae são as mais ativas no processo de descarboxilação da histidina, destacando-se as espécies *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei*, e os gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Clostridium*^{10,19,23,24}.

Neste contexto, a pesquisa objetivou avaliar quantitativamente a microbiota bacteriana mesófila total, psicrotrófica e histamina positiva presentes em camarões comercializados na cidade de Salvador – BA.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em diferentes pontos de venda da cidade de Salvador, sendo 20 provenientes de camarão de cativeiro e 20 de captura, cada uma delas com peso médio ao redor de 0,5kg.

As amostras de camarão provenientes de cativeiro encontravam-se congeladas e as de captura foram coletadas nas condições em que eram comercializadas em temperaturas que variaram de 2,0°C a 24,5°C. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e levadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia – UFBA, para o processamento das análises.

Para o preparo da suspensão inicial, foram pesadas 25g de cada amostra e colocadas em 225mL de água peptonada 0,1%, em seguida homogeneizadas em homogeneizador de pistão. A partir da suspensão inicial foram preparadas diluições decimais sucessivas e 1mL de cada diluição foi inoculado em placa de Petri, utilizando a técnica de “pour plate”, o meio ágar Niven¹⁹ preparado com: triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2,7%, HCl 0,5%, NaCl 0,5%, CaCO₃ 0,1%, ágar 2,0%, e vermelho de cresol 0,02%, com sobrecamada do mesmo meio, para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos e bactérias presuntivas histamina-positivas. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C (mesófilos) e 20°C (psicrotróficos), por um período de 48 e 72 horas, respectivamente. Após o período de incubação, realizou-se a contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas e das colônias típicas presuntivas histamina-positivas, caracterizadas pela presença de um halo arroxeadado, indicando a alcalinização do meio pela presença da amina^{16,19,24}. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

Para confirmação de bactérias histamina-positivas, as colônias com halo arroxeadado foram inoculadas em tubos

contendo tubo de Durham invertido e o meio caldo Níven modificado^{19,24} preparado com: triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2%, NaCl 0,5%, vermelho de bromocresol 0,02%. O teste positivo foi observado pela presença de gás nos tubos de Durham e pela coloração roxa do meio.

As culturas puras obtidas a partir do inóculo do teste confirmativo de bactérias histamina-positivas foram isoladas em meio ágar Níven modificado²⁴ e, em seguida, identificadas utilizando o kit API-20E[®] Enteric Identification System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)^{25,26}. O kit contém 20 reações bioquímicas para identificação do isolado. Assim, cada isolado foi inoculado e incubado de acordo com as instruções do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em referência às contagens totais de bactérias em ágar Níven, as amostras de camarão de cativeiro apresentaram, para o grupo das mesófilas, contagem variando de 1,84 log UFC/g a 3,74 log UFC/g, enquanto que no grupo das psicotróficas de <1 log UFC/g a 3,51 log UFC/g. Os valores máximos obtidos nas contagens de microrganismos mesófilos e psicotróficos em amostras de camarão de cativeiro encontram-se abaixo do limite sugerido para pescado²⁷. Constatou-se que essas amostras não apresentaram contagem de bactérias presuntivamente histamina-positivas. A ausência desses microrganismos indica que esses camarões estão sendo beneficiados e comercializados em condições de higiene e

temperatura adequadas, pois os números e tipos de microrganismos responsáveis pela produção de aminas biogênicas em pescados podem ser reduzidos e/ou inibidos com o congelamento, prolongando a vida útil do produto^{6,28}.

Para as amostras de camarão de captura houve uma variação de 4,23 log UFC/g a 7,81 log UFC/g na contagem de mesófilos e de 5,04 log UFC/g a 7,49 log UFC/g na de psicotróficos. Verificou-se na contagem de colônias presuntivamente histamina-positivas uma variação de 1,3 log UFC/g a 6,97 log UFC/g para mesófilos e de 1 log UFC/g a 6,86 log UFC/g para psicotróficos.

Estudos realizados com amostras de camarão de captura conservadas em gelo²² relataram contagens de 5 log UFC/g de bactérias mesófilas e contagens superiores de bactérias psicotróficas. Nesse mesmo trabalho, os autores observaram a presença de bactérias histamina-positivas em uma população de 2 log UFC/g. Após 14 dias de estocagem em gelo, a população microbiana aumentou para 6 log UFC/g, além da detecção de aminas biogênicas²².

A legislação brasileira²⁹ não prevê limites para a contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas em pescado porém sabe-se que populações elevadas podem reduzir a vida útil do pescado³⁰. A “International Commission on Microbiological Specification for Foods” (ICMFS)³¹ estabelece o limite máximo de 7,0 log UFC/g para contagem padrão de placas de microrganismos aeróbios para pescado²⁷. Entretanto, alguns pesquisadores consideram crítica contagem de mesófilos acima de 6 log UFC/g em pescados, mesmo não apresentando

Tabela 1. Amostras de camarão de captura com colônias presuntivas e confirmadas quanto a produção de histamina.

Amostras	Mesófilos (35 °C)		Psicotróficos (20 °C)	
	Colônias presuntivas	Colônias confirmadas	Colônias presuntivas	Colônias confirmadas
04	+	-	+	-
05	+	-	+	-
06	-	-	+	-
07	+	-	+	+
08	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	-	+	+
21	+	+	-	-
22	+	-	-	-
23	+	-	-	-
25	+	+	-	-
26	+	+	-	-
27	+	+	-	-
28	+	-	-	-
Total/14	13	06	07	04

(+) indica presença (-) indica ausência

alterações visíveis³².

Das 20 amostras de camarão de captura, seis não apresentaram desenvolvimento de colônias presuntivas para bactérias mesofílicas e psicrotróficas. De acordo com a Tabela 1, observa-se que no grupo das bactérias mesófilas, das 14 amostras com desenvolvimento microbiano, 13(92,85%) apresentaram colônias presuntivas histamina-positivas e seis (42,85%) foram confirmadas quanto à capacidade de produção de histamina. Para o grupo das bactérias psicrotróficas, observa-se que sete amostras (50%) apresentaram colônias presuntivas histamina-positivas, e somente quatro (28,57%) confirmaram a capacidade de produção de histamina. Verifica-se na Tabela 1 que das colônias confirmadas histamina-positivas, quatro (28,57%) pertencem exclusivamente ao grupo das mesófilas, duas (14,29%) pertencem ao grupo das psicrotróficas, sendo que duas (14,29%) pertencem aos dois grupos. A confirmação de bactéria histamina-positiva relata uma deficiência na temperatura de acondicionamento das amostras de camarão de captura.

Sabe-se que a conservação de camarão e outros pescados em temperaturas elevadas por longos períodos é favorável ao desenvolvimento da microbiota endógena e dos microrganismos contaminantes^{11,33}. Com isso, a variação da temperatura de comercialização pode ter contribuído para desenvolvimento de bactérias histamina-positivas nas amostras de camarão de captura analisadas.

A presença de espécies bacterianas histamina-positivas é relatada em temperaturas de aproximadamente 20°C em pescados¹⁰ e, foi demonstrado que temperatura de estocagem de 22 °C favorece tanto a multiplicação de bactéria produtora de histamina quanto a produção dessa amina¹³.

As bactérias mesófilas e psicrotróficas produtoras de histaminas presentes em amostras de camarão de captura foram identificadas (kit API-20E®) e apresentadas na Tabela 2. Do total de 18 amostras analisadas, percebe-se que a maior proporção da microbiota mesófila identificada pertence a

família Enterobacteriaceae, abrangendo o gênero *Enterobacter*, seguida pela presença da espécie *Klebsiella oxytoca*. Com relação os microrganismos psicrotróficos identificados, a bactéria *Enterobacter cloacae* é a espécie predominante. Essa espécie foi identificada em maior proporção tanto nos isolados mesófilos quanto psicrotróficos (38,8%). Verifica-se que as espécies *Escherichia coli*, *Vibrio fluvialis* e *Aeromonas* spp. pertencem ao grupo de microrganismos psicrotróficos.

Ao contrário do estudo apresentado na literatura²², as espécies bactérias histamina-positivas *Aeromonas* sp. e *Vibrio* sp. foram detectadas em menor número, enquanto que a flora bacteriana pertencente ao gênero *Enterobacter* foi identificada em maior quantidade.

A predominância do gênero *Enterobacter* entre as bactérias produtoras de histamina observada neste estudo infere que as amostras de camarão de captura estavam sendo comercializadas de maneira inadequada, uma vez que esses microrganismos não fazem parte da sua flora normal. Alguns autores constataram^{10,13,22} que a temperatura ótima para o desenvolvimento de bactérias da família Enterobacteriaceae, incluindo *Enterobacter* spp., relacionada a produção de histamina, situa-se na faixa entre 10°C e 25°C, coincidindo com aquela encontrada quando no momento da colheita das amostras.

CONCLUSÃO

De acordo com o experimento e resultados obtidos conclui-se que as condições de beneficiamento e comercialização foram adequadas para as amostras de camarão de cativeiro, reduzindo consideravelmente o desenvolvimento de bactérias histamina-positivas.

A grande variação da temperatura de armazenamento e comercialização das amostras de camarão de captura, obtidas

Tabela 2. Bactérias produtoras de histamina isoladas em amostras de camarão de captura.

Bactérias	Grupos		Amostras	%
	Mesófilas	Psicrotróficas		
<i>Enterobacter cloacae</i>	05	02	07	38,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	04	-	04	22,0
<i>Enterobacter spp</i>	01	-	01	5,6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	01	-	01	5,6
<i>Escherichia coli</i>	-	01	01	5,6
<i>Hafnia alvei</i>	01	-	01	5,6
<i>Vibrio metschnikovii</i>	01	-	01	5,6
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	01	01	5,6
<i>Aeromonas spp</i>	-	01	01	5,6
TOTAL	13	05	18	100,0

no comércio local, justifica os altos valores de contagem total de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e histamina positivos.

A confirmação de bactérias histamina-positivas pertencente a família Enterobacteriaceae indica a falta de boas práticas de fabricação e temperatura inadequada após a captura. Portanto, a presença do gênero *Enterobacter* comprova que as amostras de camarão de captura foram contaminadas por microrganismos não pertencentes à sua flora normal, o que pode acarretar na formação de histamina e uma possível intoxicação alimentar histamínica após o consumo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro e ao CNPq pelo oferecimento de recurso na forma de bolsa.

REFERÊNCIAS

1. Csavas I. The impact of aquaculture on the shrimp industry. *Infotish Intl* 1993; 1: 42-8.
2. FAO. Departamento de pesca y acuicultura. El estado mundial de La pesca y La acuicultura, 2006. [Acesso em 2008 Abril 20]. Disponível em: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699s/a0699s.pdf>.
3. Rieche FC, Moraes JEMM. In: III Simpósio internacional sobre a indústria do camarão cultivado, realizado em paralelo à realização da terceira edição da Feira Nacional do Camarão (FENACAM), Natal, 2006. *Rev BNDES* 2006; 13 (26): 309-14.
4. Braga SP, Gomes FSP, Silva CA, Souza SEL, Sousa CP. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17 Fortaleza, 2000. Resumos. Fortaleza: SBCTA, 2000; 1: 4.80.
5. Siqueira AAZC. Efeitos da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da tilápia (*Oreochromis niloticus*) [Dissertação]. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 137 pp.
6. Brandão WN. Beneficiamento de camarões marinhos. Rede de tecnologia da Bahia – RETEC/BA, 2007. 25 pp.
7. Jay JM. Frutos do Mar. In: JAY J.M. editor. *Microbiologia de Alimentos* 6ª ed. Porto Alegre: Arned, 2005, p.119-28.
8. Braga SP, Gomes FSP, Silva CA, Souza SEL, Sousa CP. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17 Fortaleza, 2000. Resumos. Fortaleza: SBCTA, 2000; 1: 4.80.
9. Soccol MCH. Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*), minimamente processada e armazenada sob refrigeração [Dissertação]. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. 124 pp.
10. Emborg J, Laursen BG, Dalgaard P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacores*) at 2°C – effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *Int J Food Microbiol* 2005; 101: 263-79.
11. Yokoyama VA. Qualidade do camarão da espécie *Xiphopenaeus kroyeri* mediante a ação dos agentes antimelanócitos [Dissertação]. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. 124 pp.
12. Silveira NFAS. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre [Tese]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2002. 69 pp.
13. Du WX, Lin CM, Phu AT, Cornell JA, Marshall MR, Wei CI. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Food Microbiology and Safety* 2002; 16 (1): 292-301.
14. Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol* 2000; 58: 1-37.
15. Tsai Y-H, Chang S-C, Kung H-F. Histamine contents and histamine-forming bacteria in natto products in Taiwan. *Food Control* 2007; 18: 1026-30.
16. Kung H-F, Lee Y-H, Chang S-C, Wei C-I, Tsai Y-H. Histamine contents and histamine-forming bacteria in sufu products in Taiwan. *Food Control* 2007; 18: 381-86.
17. Moreno RB, Torres EFS, Neto JMM. Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo. *REVENET DTA*, 2003; 3(5):151-9.
18. Germano PML, Miguel O, Germano MIS. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Hig aliment* 1993; 7 (27): 6-11.
19. Silveira NFA, Leitão MFF, Baldini VLS, Teixeira Filho AR. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre. *Braz J Food Technol* 2001; 4: 19-25.
20. Mourão JOB, Pires KMS, Sousa MB, Viana FA, Saker-Sampaio S. Estudo preliminar sobre a ocorrência de histamina em macroalgas marinhas do Estado do Ceará. *Ciênc Agron* 2007; 38 (1): 64-8.
21. Lima AS, Glória MBA. Aminas bioativas em alimentos. *Bol SBCTA* 1999; 33 (1): 70-9.
22. Lakshmanan R, Shakila RJ, Jeyasekaran G. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiol* 2002; 19: 617-25.
23. Tsai Y-H, Lin C-Y, Chang S-C, Chen H-C, Kung H-F; Wei C-I et al. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiol* 2005; 22: 461-7.
24. Mavromatis P, Quantick P. Modification of Niven's Medium for enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. *J Food Prot* 2002; 65 (3): 546-51.
25. Menozzi MG, Eigner U, Covan S, Rossi S, Somenzi P, Dettori G, Chezzi C, Fahr A-M. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (11): 4085-94.

26. Nucera DM, Maddox CW, Hoiem-Dalen P, Weigel RM. Comparison of API 20E and invA PCR for identification of *Salmonella* enteric isolates from swine production units. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (9): 3388-90.
27. Agnese AP, Oliveira VM, Silva PPO, Oliveira GA. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica - RJ. *Hig Aliment* 2001; 15 (88): 67-70.
28. Dalgaard P, Madsen HL, Samieian N, Emborg J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J Appl Microbiol* 2006; 101(1): 80-95.
29. Brasil. Portaria nº 185 de 1997 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Pescados e Derivados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 mai.1997. C.7, seção 1.
30. Kirschink, P. G.; Viegas, E. M. M. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* durante estocagem em gelo. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004; 24(3):407-12.
31. International Commission On Microbiological Specification for Foods. Pescados y productos derivados. In:_____. Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentares. Zaragoza: Acribia, 1998; 121-66.
32. Lira GM, Pereira WD, Athayde AH. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió - AL. *Hig Aliment* 2001; 15 (84): 67-74.
33. Economou V, Brett MM, Papadopoulou C, Frillingos S, Nichols T. Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse. *Food Addit Contam* 2007; 24(8):820-32.