

## Cobertura de amido de milho com óleo essencial de *Origanum vulgare* para controle de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri*

Cornstarch cover with *Origanum vulgare* essential oil to control *Vibrio parahaemolyticus* in fillets of *Micropogonias furnieri*

Recubrimiento de almidón de maíz con aceite esencial de *Origanum vulgare* para controlar *Vibrio parahaemolyticus* en filetes de *Micropogonias furnieri*

Recebido: 21/06/2021 | Revisado: 29/06/2021 | Aceito: 07/07/2021 | Publicado: 17/07/2021

**Amanda Barbosa Atrib**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0600-8591>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: amanda\_b\_atrib@hotmail.com

**Débora Rodrigues Silveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7245-279X>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: debora.rsilveira@hotmail.com

**Cláudio Dias Timm**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3920-9066>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: timm@ufpe.co

### Resumo

O pescado pode ser contaminado no ambiente em que vive ou durante a manipulação após a captura. A espécie bacteriana *Vibrio parahaemolyticus* é uma das principais causadoras de surtos associados ao consumo de pescados contaminados. Os óleos essenciais vêm sendo utilizados no preparo de alimentos em virtude do sabor e aroma diferenciados. O óleo essencial de *Origanum vulgare* se destaca pela capacidade de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. As coberturas contendo óleo essencial ganharam reconhecimento ultimamente. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *O. vulgare* associado a cobertura comestível de amido em filé de peixe. O efeito do óleo de *O. Vulgare* foi testado *in vitro* pelo teste de disco-difusão. Posteriormente, cobertura de amido com 1% e 1,5% de óleo essencial de *O. vulgare* foi aplicada em filés de *M. furnieri* experimentalmente contaminados com *V. parahaemolyticus*. Como controle, filés sem cobertura e com cobertura sem óleo também foram testados. Foram realizadas contagens de *V. parahaemolyticus* após 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 10 dias de estocagem. No teste de disco-difusão o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. A cobertura de amido associada ao óleo essencial de *O. vulgare* foi eficiente para reduzir a multiplicação bacteriana nos filés de peixe nas duas concentrações utilizadas no estudo. A utilização de cobertura de amido com óleo essencial de *O. vulgare* no controle de *V. parahaemolyticus* em pescados é uma alternativa promissora para o consumo seguro desses alimentos.

**Palavras-chave:** Pescado; Orégano; Atividade antimicrobiana; Cobertura comestível; Vibriose.

### Abstract

Fish can be contaminated in the environment in which they live or during handling after a catch. A bacterial species *Vibrio parahaemolyticus* is one of the main causes of outbreaks associated with the consumption of contaminated fish. Essential oils used in food preparation due to their different flavor and aroma. The essential oil of *Origanum vulgare* stands out for its ability to inhibit the growth of unwanted microorganisms. Toppings containing essential oil have gained recognition lately. The aim of the study was to evaluate an antimicrobial activity of *O. vulgare* essential oil associated with an edible starch coating in fish fillet. The effect of *O. Vulgare* oil was tested *in vitro* by disk-diffusion test. Subsequently, starch coating with 1% and 1.5% of *O. vulgare* essential oil was applied to *M. furnieri* fillets experimentally contaminated with *V. parahaemolyticus*. As a control, uncoated and oil-free coated fillets were also tested. Counts of *V. parahaemolyticus* were performed after 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 10 days of storage. In the disk-diffusion test, the essential oil of *O. vulgare* showed an inhibitory effect on bacterial growth. Starch coating associated with *O. vulgare* essential oil was efficient to reduce bacterial multiplication in fish fillets in the two tools used in the study. The use of starch coating with *O. vulgare* essential oil to control *V. parahaemolyticus* in fish is a promising alternative for safe food consumption.

**Keywords:** Fish; Oregano; Antimicrobial activity; Edible cover; Vibriosis.

## Resumen

Los peces pueden contaminarse en el entorno en el que viven o durante la manipulación después de la captura. La especie bacteriana *Vibrio parahaemolyticus* es una de las principales causas de brotes asociados al consumo de pescado contaminado. Los aceites esenciales se han utilizado en la preparación de alimentos debido a su diferente sabor y aroma. El aceite esencial de *Origanum vulgare* destaca por su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados. Las coberturas que contienen aceite esencial han ganado reconocimiento últimamente. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *O. vulgare* asociado con la cobertura de almidón comestible en filetes de pescado. El efecto del aceite de *O. Vulgare* se probó *in vitro* mediante la prueba de difusión en disco. Posteriormente, se aplicó una capa de almidón con 1% y 1,5% de aceite esencial de *O. vulgare* a filetes de *M. furnieri* contaminados experimentalmente con *V. parahaemolyticus*. Como control, también se probaron filetes sin recubrimiento y sin aceite. Se realizaron recuentos de *V. parahaemolyticus* después de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 10 días de almacenamiento. En la prueba de difusión en disco, el aceite esencial de *O. vulgare* mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. El recubrimiento de almidón asociado con el aceite esencial de *O. vulgare* fue eficaz para reducir la multiplicación bacteriana en los filetes de pescado en las dos concentraciones utilizadas en el estudio. El uso de almidón recubierto con aceite esencial de *O. vulgare* para controlar *V. parahaemolyticus* en el pescado es una alternativa prometedora para el consumo seguro de estos alimentos.

**Palabras clave:** Pescado; Orégano; Actividad antimicrobiana; Cobertura comestible; Vibriosis.

## 1. Introdução

O pescado desempenha um papel importante na nutrição humana, fornecendo pelo menos 20% da ingestão de proteína para um terço da população mundial. Seu consumo é maior nos países em desenvolvimento (Mohanty *et al.*, 2013). O alto consumo de pescados crus e malcozidos tornou-se uma das causas mais comuns de gastroenterite transmitida por alimentos, pois esses alimentos contêm nutrientes necessários para a multiplicação de vários patógenos transmitidos por alimentos, incluindo os Vibrios (Wu *et al.*, 2018). As doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem um dos problemas de saúde pública mais frequente do mundo todo. São causadas por agentes etiológicos, principalmente microrganismos, os quais infectam o organismo humano através da ingestão de água e alimentos contaminados (Welker *et al.*, 2010). *Vibrio* spp. estão entre os principais causadores de surtos associados à pescados. As espécies *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio cholera* são as mais frequentes causadoras de doenças em humanos (Yan *et al.*, 2019).

*V. parahaemolyticus* é uma bactéria patogênica Gram-negativa. Como é a mais prevalente causadora de DTA entre as 30 espécies de *Vibrio* conhecidas, tornou-se a principal preocupação de segurança alimentar em muitos países asiáticos (Wu *et al.*, 2018). Esta espécie é a principal causadora de gastroenterite associada ao consumo de pescados nos Estados Unidos e um importante patógeno transmitido por pescados relatado em todo o mundo (Su & Liu, 2007).

É crescente a busca por tecnologias não convencionais para o processamento de alimentos. Como a alta qualidade é um dos desafios da indústria de alimentos, técnicas de preservação moderadas, capazes de manter a qualidade inicial dos alimentos e reduzir a carga microbiana estão sendo consideradas interessantes por processadores de alimentos (Silva *et al.*, 2019). Os óleos essenciais vêm sendo usados como uma opção para substituir os conservantes sintéticos ou de outra origem que não naturais, devido a sua atividade antioxidante e seus efeitos antimicrobianos (Jayasena & Jo, 2013). O uso de coberturas adicionadas de óleos essenciais pode reduzir as perdas e deterioração dos alimentos, aumentando sua vida útil e tornando-o um produto mais atrativo para o consumidor e mais seguro para o consumo. Segundo Cutter (2006), agentes antimicrobianos, quando são incorporados em coberturas/filmes, podem ser eficazes para reduzir o número de microrganismos de origem alimentar.

Com isso, os objetivos deste estudo foram: avaliar a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *O. vulgare* associado a cobertura comestível de amido em filé de peixe para controle de *V. parahaemolyticus*; verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* frente a *V. parahaemolyticus*; verificar o comportamento de *V. parahaemolyticus* em filés de *M. furnieri* e avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* associado à cobertura de amido frente à *V. parahaemolyticus* na matriz alimentar de pescados da espécie *M. furnieri*.

## 2. Metodologia

### Óleo essencial

O óleo essencial de *O. vulgare* (Ferquima®) foi adquirido comercialmente. Principais componentes: carvacrol (72%); timol (2%); gama-terpineno (4,5%); para-cimeno (4%); linalol (4%). Origem: Moldávia. Extraído por destilação a vapor de plantas. Isento de impurezas.

### Cepas bacterianas

As cepas de *V. parahaemolyticus* utilizadas no disco-difusão foram ATCC 8001 e duas cepas previamente isoladas de *M. furnieri* (cepa V42) e de *F. paulensis* (cepa V58) por Rosa *et al.* (2016). Para a contaminação experimental do pescado foi utilizada somente a cepa ATCC 8001.

Os isolados, mantidos a -20°C em Água Peptonada Alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) com 1% de cloreto de sódio (APA 1% NaCl) e 20% de glicerol, foram recuperados em APA 1% NaCl durante 24 h a 37°C, em duas culturas consecutivas, sempre que necessário.

### Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

O método de disco-difusão foi realizado conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2012), com pequenas modificações para adaptar a técnica para *Vibrio*. Uma alíquota de 0,1 mL de cultura *overnight* em APA 1% NaCl de cada microrganismo foi semeada com auxílio de alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Acumedia) com 1% de NaCl. Discos de papel filtro estéreis impregnados com o óleo essencial (5 µL por disco com 6 mm de diâmetro) foram depositados sobre o meio inoculado, que foi incubado a 37°C por 24h.

O diâmetro da zona de inibição, incluindo o diâmetro do disco, foi medido em milímetros e a atividade inibitória foi classificada em forte, diâmetro > 15 mm, moderada, 10 a 15 mm de zona de inibição, ou sem ação inibitória, quando o diâmetro foi < 10 mm, segundo estipulado por Carovic-Stanko *et al.* (2010).

### Contaminação experimental dos pescados

Foram utilizadas porções de 10 g de filé de *M. furnieri*. As porções de filé foram experimentalmente contaminadas com *V. parahaemolyticus* em testes individuais. Inóculos de diluições seriadas das culturas bacterianas foram preparados e 0,1 mL da diluição 10<sup>3</sup> UFC/mL foi colocado em sacos estéreis contendo os 10 g do pescado, obtendo-se a concentração final de 10<sup>1</sup> células bacterianas por grama de pescado. Foram preparadas e analisadas também amostras sem contaminação experimental e sem aplicação da cobertura com óleo, para confirmar que não havia prévia contaminação do pescado por *Vibrio* spp.; amostras experimentalmente contaminadas, mas sem aplicação da cobertura com óleo, como controle da contaminação experimental; e amostras experimentalmente contaminadas e com cobertura, mas sem o óleo, para controle do efeito do amido sobre o microrganismo. O experimento foi realizado em triplicata.

### Produção e aplicação da cobertura

O revestimento foi preparado utilizando 3% de amido de milho (Silva *et al.*, 2007). Para seu preparo, se utilizou água destilada que foi aquecida juntamente com o amido, mexendo constantemente, até atingir 70°C. Após resfriado, foi adicionado o óleo essencial de *O. vulgare* de forma a se obter as concentrações de 1% e 1,5%.

Os pescados foram imersos na cobertura e submetidos à secagem em temperatura ambiente. Após, foram recolocados em sacos estéreis e armazenados sob refrigeração a 4°C. Foram realizadas contagens após 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 10 dias de estocagem.

### Avaliação da eficiência do óleo essencial de *Origanum vulgare*

As contagens de *Vibrio* foram realizadas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration - FDA (Kaysner & DePaola, 2004), com modificação, substituindo a identificação bioquímica por reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram adicionados 90 mL de Solução Salina 1% NaCl (SS 1%) às amostras previamente acondicionadas em sacos estéreis e massageados por 5 minutos de forma a obter-se a diluição  $10^{-1}$ . Foi semeado 1 mL da diluição  $10^{-1}$  em três tubos contendo 10 mL de APA 1% NaCl. Para a próxima diluição, foi inoculado 1 mL do inóculo  $10^{-1}$  em 10 mL de SS 1%, configurando a diluição  $10^{-2}$ , e alíquotas de 1 mL foram semeadas em mais 3 tubos contendo 10 mL APA 1% NaCl. Diluições subsequentes foram realizadas até que fosse possível a quantificação da população bacteriana na amostra de pescado. Após incubação a 37°C por 24 horas, a presença de *Vibrio* em cada tubo foi confirmada pela semeadura e incubação em ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS, NEOGEN Cultere Media 7210A), incubado a 37°C por 24h e o valor final das contagens foi obtido comparando-se os resultados de presença ou ausência de *Vibrio* nos tubos à tabela do NMP.

### PCR para identificação de *Vibrio parahaemolyticus*

O DNA dos isolados foi extraído conforme Sambrook & Russel (2001). Resumidamente, colônias obtidas no ágar TCBS foram ressuspensas em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M, NaCl 0,5 M, SDS 0,1% (m/v), EDTA 0,01 M, pH 7,6], aos quais foram adicionados 50 µL de pérolas de vidro e 100 µL de fenol/clorofórmio. Após homogeneização por 1 min, a mistura foi centrifugada a 13.000 g por 5 min. O sobrenadante foi coletado e precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de NaCl 5 M a -70°C por 30 min. Uma nova centrifugação foi realizada a 13.000 g por 20 min, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol a 70%. Foi realizada a eluição em 40 µL de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). O DNA extraído foi estocado a -70°C.

A PCR foi realizada conforme Bilung *et al.* (2005), com modificações. Cada reação teve um volume final de 20 µL. Foram utilizados 10 µL de Master Mix, 1 µL (10 pmol) de cada *primer* (Tabela 1), 1,2 µL de DNA e 6,8 µL de água para completar o volume da reação. A amplificação foi realizada em termociclador TC-3000 com o seguinte programa: desnaturação inicial de 96°C por 5 min, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 63°C por 1,5 min, extensão a 72°C por 1,5 min e extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos da PCR foram corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, Brasil) e a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,8%. Como controle positivo, foi utilizada a cepa de *V. parahaemolyticus* ATCC 8001.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados na identificação de *V. parahaemolyticus*.

<i>Primer</i>	Sequência (5' a 3')	Tamanho da amplificação (pb)	Referência
<i>ToxR-a</i>	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368	Kim <i>et al.</i> (1999)
<i>ToxR-b</i>	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG		

Fonte: Autores.

### Análise estatística

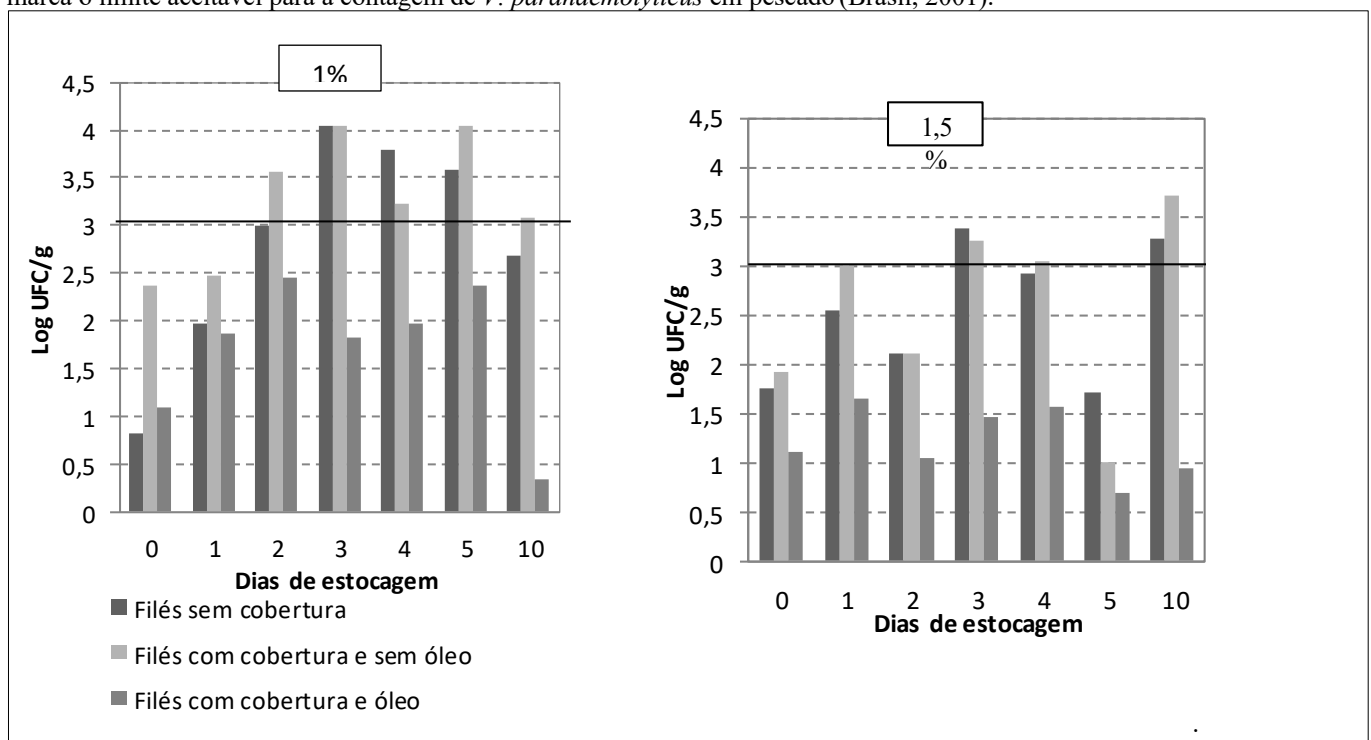
Foram aplicadas a análise de variância e o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para avaliação estatística dos resultados obtidos nas análises microbiológicas nos testes de aplicação da cobertura de amido com óleo essencial de *O. vulgare*.

### 3. Resultados

Na análise de disco-difusão, o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. O diâmetro dos halos de inibição foi de 28 mm quando testadas as cepas ATCC 8001 e V42 e de 23 mm no teste com a cepa V58. O óleo testado apresentou halos de inibição que, de acordo com Carovic-Stanko *et al.* (2010), são considerados como de forte atividade antimicrobiana.

A cobertura associada ao óleo essencial de *O. vulgare* foi eficiente para reduzir o crescimento bacteriano nos filés de peixe experimentalmente contaminados, tanto na concentração de 1%, quanto na concentração de 1,5%, controlando a multiplicação de *V. parahaemolyticus* e mantendo as contagens abaixo de  $10^3$  UFC/g (Figura 1). Este limite foi utilizado como referência para o ponto de corte por ser recomendado pela Instrução Normativa nº 12 de 02/01/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2001). Embora esta normativa tenha sido substituída pela Instrução Normativa nº 60, de 23/12/2019 (Brasil, 2019), esta última não prevê limites para a contagem de *Vibrio* spp. em pescados. A contagem de *V. parahaemolyticus* no controle negativo foi  $>3$  NMP/g.

**Figura 1.** Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri* experimentalmente contaminados cobertos com película de amido contendo 1% e 1,5% de óleo de *Origanum vulgare*, armazenados a 4°C. A linha contínua marca o limite aceitável para a contagem de *V. parahaemolyticus* em pescado (Brasil, 2001).

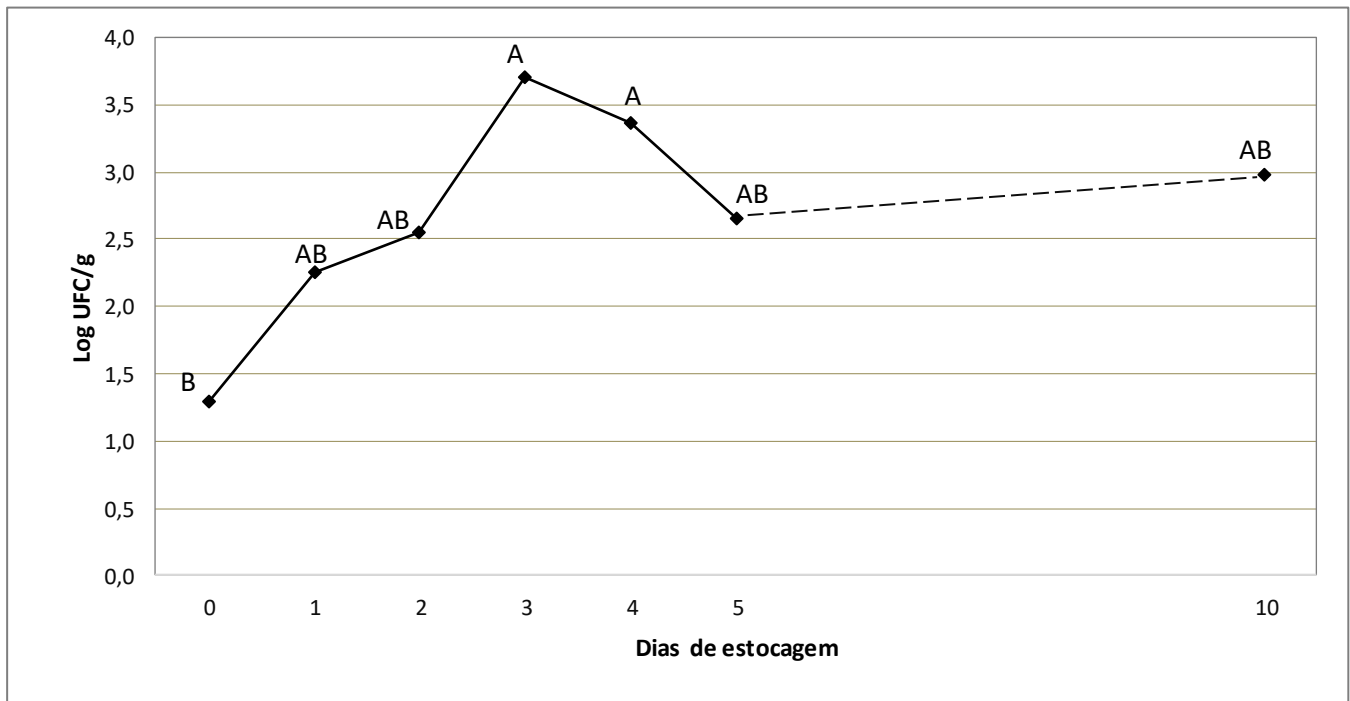


Fonte: Autores.

Houve diferença estatisticamente significativa entre o tratamento com a cobertura adicionada de óleo e os tratamentos sem cobertura e com cobertura sem óleo, o que significa que o efeito nas contagens foi devido à presença de óleo na cobertura de amido. Os tratamentos sem cobertura e com cobertura sem óleo foram estatisticamente iguais, ou seja, não houve efeito da cobertura, indicando que a cobertura de amido não afeta as contagens de *V. parahaemolyticus* nos filés. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as repetições.

Quanto ao comportamento de *V. parahaemolyticus* em filés de *M. furnieri*, o microrganismo é capaz de se adaptar à matriz alimentar do pescado e atingir em poucos dias altas concentrações em condições usuais de estocagem, as quais depois diminuem, mas se mantêm em concentrações intermediárias (Figura 2).

**Figura 2.** Comportamento de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri* experimentalmente contaminados (média de seis repetições). Médias com as mesmas letras são estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



Fonte: Autores.

#### 4. Discussão

No teste de disco-difusão, foi observada a inibição do crescimento de *V. parahaemolyticus* pelo óleo essencial de *O. vulgare*. Resultados semelhantes foram obtidos por Mello *et al.* (2018), que testaram a ação do óleo essencial de *O. Vulgare* contra *V. parahaemolyticus* no teste de disco-difusão e observaram halos de inibição indicando atividade antimicrobiana.

Neste estudo o óleo essencial de *O. vulgare* na concentração de 1% e 1,5% foi eficaz para o controle de *V. parahaemolyticus* ao longo dos dias de estocagem. Trabalhos sobre o controle microbiológico em pescados utilizando cobertura com óleos essenciais são raros na literatura, especialmente visando o controle de *V. parahaemolyticus* e empregando a metodologia utilizada no nosso estudo. O presente trabalho é um dos poucos com uso de óleo essencial de *O. vulgare* no controle desta bactéria em alimentos e o primeiro utilizando cobertura de amido incorporada de óleo essencial no controle de *V. parahaemolyticus* em pescados.

Um trabalho semelhante, porém, utilizando o óleo de *O. vulgare* para marinar pescados da espécie *M. platanus* foi realizado por Mello *et al.* (2018). Estes autores testaram o efeito de *O. vulgare* no controle de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em filés de *M. platanus* nas concentrações de 1% e 1,5%. Quando os filés contaminados experimentalmente foram marinados em solução com concentração de 1% de óleo essencial de *O. vulgare* não houve efeito bactericida, mas o efeito foi observado quando foram marinados em solução de 1,5%. Esta diferença nos resultados obtidos com 1% de óleo pode ser devida ao contato do óleo com o filé por mais tempo quando utilizado associado a cobertura de amido, uma vez que marinado era escorrido após a imersão e com a cobertura o óleo permanece no filme de amido que recobre o filé durante o



armazenamento. Outro fator que talvez possa ter influenciado são as características intrínsecas das espécies de peixe utilizadas em cada estudo, que foram distintas.

As contagens de *V. parahaemolyticus* foram menores nos filés com cobertura com adição do óleo essencial ao longo da estocagem, indicando que o óleo essencial de *O. vulgare* é capaz de inibir o crescimento de *V. parahaemolyticus*. Em estudo realizado Tavares *et al.* (2014), foi avaliado o uso de cobertura comestível a base de alginato adicionada de óleo essencial de *O. vulgare* em ricota frente a coliformes totais, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* coagulase positiva. O óleo de *O. vulgare* não mostrou efeito inibitório sobre as bactérias testadas. Estes resultados, quando comparados aos do presente estudo, demonstram que o óleo essencial de *O. vulgare* apresenta diferente ação dependendo do microrganismo pesquisado e da matriz alimentar, sendo necessários estudos específicos quanto ao microrganismo e o alimento para verificação da capacidade inibitória e possível aplicação nos produtos.

A espécie *V. parahaemolyticus* foi capaz de se multiplicar e atingir altas concentrações nos filés de *M. furnieri* (Figura 2). Em trabalho conduzido por Mudoh *et al.* (2014) foi analisado o comportamento de *V. parahaemolyticus* experimentalmente inoculado em *Crassostrea virginica* (ostras), os pescados foram submetidos a três temperaturas de armazenamento, 5°, 10° e 20°C. A concentração utilizada para contaminação experimental foi de 3,5 log UFC/g de *V. parahaemolyticus*. Foi observado um crescimento acentuado do microrganismo, chegando a 7,5 log NMP/g no décimo dia de armazenamento a 20°C, nas temperaturas de 5 e 10°C não houve crescimento observado nas contagens. No nosso trabalho, a concentração inicial foi mais baixa e a temperatura utilizada foi de 4°C, mesmo assim as populações aumentaram atingindo índices que ultrapassaram 10<sup>3</sup> UFC/g, limite máximo considerado como seguro para o consumo de pescados (Brasil, 2001), o que não ocorreu no trabalho de Mudoh *et al.*, (2014), onde a temperatura de 5 e 10°C foram eficientes para controlar o crescimento de *V. parahaemolyticus*, isso pode ter se dado devido a característica intrínseca de *C. virginica* e filés de *M. furnieri*, podendo influenciar no crescimento de microrganismos e armazenamento.

Em estudo realizado por Beuchat (1973) foi visto uma diminuição inicial na população viável da cepa de *V. parahaemolyticus* no camarão inteiro, e após um aumento entre 4 e 8 dias a 7°C. Kaneko & Colwell (1973) relataram que 10°C foi a temperatura mínima para crescimento de *V. parahaemolyticus* em um ambiente natural. Estes estudos mostram que o *V. parahaemolyticus* foram capazes de crescer em temperaturas usuais de conservação de pescados, como observado no presente estudo.

O grau de contaminação por *V. parahaemolyticus* em peixes crus é conhecido por estar relacionado às temperaturas ambientais. Como mencionado anteriormente, *V. parahaemolyticus* pode se multiplicar rapidamente em temperatura ambiente, comprovamos agora, que este microrganismo não é sensível à temperatura de refrigeração, podendo se multiplicar em baixa temperatura, tornando o pescado fresco não seguro e apenas posteriormente ao 3º dia de estocagem, à 4°C, a multiplicação decresce. O controle de temperatura é o mais importante para a preservação de peixe cru, no entanto, as condições de temperatura nem sempre são suficientes e frequentemente alteradas e flutuantes durante a distribuição desde a captura até a mesa do consumidor. Abuso de temperatura e manuseio incorreto podem ocasionar a multiplicação de *V. parahaemolyticus* e aumento do risco de doença associados fresco (Yang, *et al.*, 2004). O presente estudo demonstra que nem mesmo o acondicionamento do peixe já contaminado à 4°C é capaz de controlar o microrganismo nos primeiros dias de estocagem.

Sendo assim, o controle de *V. parahaemolyticus* se torna importante já que ele tem alta taxa de crescimento quando o pescado está fresco, a forma preferida de consumo. Cuidados higiênicos sanitários e incorporação de componentes com ação antimicrobiana, como o óleo essencial de *O. vulgare*, são necessários para evitar a sua multiplicação em pescados frescos. O público tem manifestado crescente interesse sobre os processos de obtenção das matérias-primas dos produtos que consome, sendo assim o uso de antimicrobianos de origem natural, como os óleos essenciais utilizados como condimentos adicionados

nos alimentos, são uma alternativa eficaz e econômica para a conservação, como foi visto no presente estudo (Bizzo *et al.*, 2009).

## 5. Conclusão

A cobertura de amido adicionada de óleo essencial de *O. vulgare* tanto na concentração de 1% quanto na concentração de 1,5%, quando aplicada a filés de *M. funieri*, é eficaz no controle de *V. parahaemolyticus* ao longo de 10 dias em temperatura usual de estocagem sob refrigeração, mantendo a concentração do patógeno dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira.

A espécie bacteriana *V. parahaemolyticus* é capaz de se adaptar à matriz alimentar do pescado e atingir altas concentrações, mesmo quando contaminado em baixa concentração inicial.

A utilização de cobertura de amido adicionada de óleo essencial de *O. vulgare* é uma alternativa promissora no controle de *V. parahaemolyticus* em pescados.

Orientações futuras para o controle microbiano em alimentos apontam para a necessidade de inovações para diminuir a contaminação por bactérias, a utilização de cobertura comestível adicionada de óleo essencial seria uma alternativa saudável e sem adição de produtos químicos. Está técnica vem atraindo bastante as indústrias de alimentos, sendo uma alternativa viável para ser utilizada no futuro para conservação dos alimentos.

## Referências

- Beauchat, L. R. (1973). Interacting Effects of pH, Temperature, and Salt Concentration on Growth and Survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied Microbiology*, 844-846.
- Bilung, M. L., Rradu, S., Bahaman, R. A., Rahim, A. R., Napis, S., Kqueen, Y. C., Murugaiah, C., & Hadi, A. Y. (2005). Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara geanosa*). *American Journal of Immunology*, (1), 31-36.
- Bizzo, H. R., Hovel, A. M. C., Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32 (3), 588-594.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Instrução Normativa Nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, 249(1), 133.
- Brasil, Agência Nacional De Vigilância Sanitária, Resolução, Resolução da Diretoria Colegiada Nº 12, de 2 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre padrões microbiológico para alimentos. *Diário Oficial da União*, Seção 1.
- Caratovic-Stanko, K., Orlic, S., Politeo, O., Strikic, F., Kolak, I., Milos, M., & Satovic, Z. (2010). Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. *Food Chemistry*, 119, 196-201.
- Clinical and Laboratory Standars Institute. M02-A11 performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (2012). Wayne, Pennsylvania, USA, 950.
- Cutter, N. C. (2006). Opportunities for bio-based packaging Technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Science*, 74 (1), 131-142.
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 34, 96-108.
- Kaneko, T., & Colwell, R. R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*. 113, 24-32.
- Kaysner, C. A., & Depaola Jr, A. & *Vibrio*. U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*, Chap. 9, 2004. Recuperado em 19 de maio de 2020, de <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-vibrio>.
- Kim, Y. B., Okuda, A, J. U. N., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., & Nishibuchi, M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4),1173-1177.
- Mello, G. S. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum* frente a *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* e sua aplicação em filés de *Mugil platanus* (2018). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.
- Mohanty, B. P., Mahanty, A., Ganguly, S., Mitra, T., Karunakaran, D., & Ananda, R. (2013). Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10835-10847.



- Mudoh, F. M., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., & Chaudhuri, A. (2014). The effects of storage temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and organoleptic properties in oysters. *Frontiers on Public Health*, (2),1-7.
- RosaA, J. V., Silva, C. J., Barbosa, F., Bairros, J., Duval, E. H., Helbig, E., & Timm, C. D. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolates in fish species captured from the Lagoa dos Patos estuary. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(3), 1345-1354.
- Sambrook, J., Russel, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (2001) (3a ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 999.
- SILVA, N. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos (2007).
- Silva, W. B., Sousa, C. L. L., Araujo, C. S., Nascimento, V. H. A., & Lourenço, L. F. H. (2019). Propriedades tecnológicas e antimicrobiana de biofilmes de proteínas de peixe com óleo essencial de cravo. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 14(2) 5642.
- Su, Y. I., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 24, 549–558.
- Tavares, F. O., Pieretti, G. G., Aantigo, J. L., Pozza, M. S. S., Scapim, M. R., & Madrona, G. S. (2014). Cobertura comestível adicionada de óleo essencial de orégano e alecrim para uso em ricota. *Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 69(4),249-257.
- Welker, C. A. D., Both, J. M. C., Longaray, S. M., Hass, S., Soeiro, M. L. T., & Ramos, R. C. (2010) Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 8(1),44-48.
- Wu, W., Zhou, M., Ele, H., Liu, C., Li, P., Wang, H., Liu, Y., Hao, X., & Fang, Z. (2018). A sensitive aptasensor for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, v. 272, 550–558.
- Yan, L., Pei, X., Zhang, X., Guan, W., Chui, H., J. H., Ma, G., Yang, S., Li, Y., Li, N., & Yang, D. (2019). Occurrence of four pathogenic Vibrios in Chinese freshwater fish farms in 2016. *Food Control*, 95, 85-89.
- Yang, Z., Jiao, X., Li, P., Pan, Z., Huang, J., Gu, R. Fang. W., & Chao, G. (2009). Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiology*. 26, 606–614.