

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos



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

Amanda Barbosa Atrib

Pelotas, 2021

Amanda Barbosa Atrib

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

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição e Alimentos da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Nutrição e
Alimentos

Orientador: Cláudio Dias Timm

Coorientadora: Débora Rodrigues Silveira

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas/Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111c Atrib, Amanda Barbosa

Cobertura de amido de milho com óleo essencial de *Origanum vulgare* para controle de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri* / Amanda Barbosa Atrib ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Débora Rodrigues Silveira, coorientadora. — Pelotas, 2021.

12 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Pescado. 2. Orégano. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Cobertura comestível. 5. Vibriose. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Silveira, Débora Rodrigues, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figs Machado CRB:
10/1612

Amanda Barbosa Atrib

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

Data da Defesa: 31/03/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm (Orientador)

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Débora Rodrigues Silveira (Coorientadora)

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Natacha Deboni Cereser

Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Helenice Gonzalez de Lima (Suplente)

Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

ATRI, Amanda Barbosa. **Cobertura de amido de milho com óleo essencial de *Origanum vulgare* para controle de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri***. Orientador: Cláudio Dias Timm. 2021. 32 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

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 e já foi isolada de peixes da espécie *Micropogonias furnieri*, no entanto, pouco se sabe sobre o comportamento deste patógeno na matriz alimentar do pescado, tampouco sobre métodos de controle. Os óleos essenciais vêm sendo utilizados no preparo de alimentos em virtude do sabor e aroma diferenciados. Dentre outras propriedades, o óleo essencial de *Origanum vulgare* se destaca pela capacidade de inibir o crescimento de determinados microrganismos indesejáveis. As coberturas contendo óleo essencial de plantas ganharam reconhecimento ultimamente, sendo empregados para uma melhora na qualidade e segurança alimentar, no entanto, ainda são necessários mais estudos acerca do tema. 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 experimentalmente contaminados nas duas concentrações utilizadas no estudo, mantendo as contagens abaixo do limite máximo admitido pela legislação brasileira. 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

ATRI, Amanda Barbosa. **Cornstarch cover with *Origanum vulgare* essential oil to control *Vibrio parahaemolyticus* in fillets of *Micropogonias furnieri***. Advisor: Cláudio Dias Timm. 2021. 32 f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) – Programa de pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Fish can be contaminated in the environment in which it lives or during handling after being caught. The bacterial species *Vibrio parahaemolyticus* is one of the main causes of outbreaks associated with the consumption of contaminated fish and has already been isolated from fish of the species *Micropogonias furnieri*, however, little is known about the behavior of this pathogen in the fish's food matrix, nor under control. The essential oils used in food preparation due to their distinctive flavor and aroma. Among other properties, the essential oil of *Origanum vulgare* stands out for its ability to inhibit the growth of undesirable microorganisms. The coverings containing essential oil of plants have gained recognition lately, being used for a better quality and food security, however, more studies on the subject are still addressed. The aim of the study was to evaluate an antimicrobial activity of *O. vulgare* essential oil associated with an edible starch cover in fish fillet. The effect of *O. Vulgare* oil was tested in vitro disc diffusion test. Subsequently, starch coverage with 1% and 1.5% essential oil of *O. vulgare* was applied to fillets of *M. furnieri* experimentally contaminated with *V. parahaemolyticus*. As a control, fillets without cover and with coverage without oil were also tested. *V. parahaemolyticus* counts 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* had an inhibitory effect on bacterial growth. The coverage associated with the essential oil of *O. vulgare* was efficient to reduce bacterial multiplication in fish fillets experimentally contaminated in the two rules used in the study, keeping as counts below the maximum limit allowed by Brazilian legislation. The use of starch cover 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

Lista de figuras

- 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*..... 22
- Figura 2 Comportamento de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri* experimentalmente contaminados, média de seis repetições..... 22

Sumário

1	Introdução.....	9
2	Revisão bibliográfica	11
2.1	Contaminação de pescados	12
2.2	<i>Vibrio</i> spp.....	14
2.2.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>.....	15
2.3	Utilização dos óleos essenciais para controle microbiano	16
2.4	Cobertura Comestível	18
2.5	Atividade antimicrobiana de cobertura incorporada com óleos essenciais	20
3	Hipótese	21
4.1	Geral	21
4.2	Específicos	21
5	Material e métodos.....	21
5.1	Óleo essencial	21
5.2	Cepas bacterianas.....	21
5.3	Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>.....	22
5.4	Aplicação no produto.....	22
5.4.1	Contaminação experimental dos pescados.....	22
5.4.2	Produção e aplicação da cobertura.....	23
5.4.3	Avaliação da eficiência do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>.....	23
5.4.3.1	PCR para identificação de <i>Vibrio parahaemolitycus</i>.....	24
5.6	Análise estatística	25
6	Resultados	25
6.1	Disco-difusão.....	25
6.2	Contaminação experimental.....	25
7	Discussão	27
8	Conclusão	30
9	Referências bibliográficas	32

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. Os peixes são ricos em minerais, incluindo o iodo, selênio, zinco, magnésio e cálcio. A importância do peixe na dieta humana e seus efeitos benéficos foram comprovados em termos de segurança alimentar, bem como no combate à desnutrição e deficiências de micronutrientes nos países em desenvolvimento (MOHANTY et al., 2013).

O clima tropical do Brasil o torna um país propício para a ocorrência e proliferação de *Vibrio* spp. O estuário da Lagoa dos Patos, localizado no extremo sul do Brasil, tem uma área de aproximadamente 963,8 km², recebendo água dos rios localizados na sua porção norte e da Lagoa Mirim, ao sul, através do Canal São Gonçalo (CALLIARI, 1998). É considerado um polo pesqueiro artesanal, devido à ocorrência de diversas espécies de peixes e crustáceos de importância comercial (REIS, 1999).

Os pescados são produtos alimentares altamente perecíveis e suscetíveis à deterioração química e microbiológica durante o processamento ou armazenamento (HASSOUN & ÇOBAN, 2017). Os principais fatores da deterioração dos peixes são a rápida instalação do “rigor mortis”, microrganismos e autólise. As reações de deterioração do pescado resultam em autólise devido à ação de proteases próprias do músculo (catepsinas e calpaínas) e de exopeptidases de origem microbiana. Após as reações proteolíticas, a amônia é a base volátil mais representativa, sendo mensurada pela análise do nitrogênio das bases voláteis totais, o seu limite estabelecido é de 30mgN/100g, o mesmo critério é adotado pelos órgãos oficiais de inspeção outros países, como Alemanha, Argentina e Austrália (ARAÚJO, et al. 2010).

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). Essa bactéria 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).

O mecanismo de enteropatogenicidade do *Vibrio parahaemolyticus* permanece uma incógnita. Durante muitos estudos sobre este microrganismo como agente causador de gastroenterite, uma atividade hemolítica, independente do sorotipo, foi reconhecida: a capacidade de produzir β -hemólise em agar Wagatsuma. O teste foi denominado Kanagawa e está estreitamente relacionado com a enteropatogenicidade, sendo adotado como parâmetro na identificação de cepas patogênicas e não-patogênicas. Essa atividade hemolítica é atribuída a uma hemolisina termoestável direta, considerada como principal fator de enteropatogenicidade, conforme relata Dadisman et al. (1973).

Outras infecções, como septicemias secundárias, otites e lesões da pele são causadas por *Vibrio parahaemolyticus*. Os casos de otites externas e lesões de pele são associados ao contato com a água do mar. Estas infecções ocorrem somente quando o microrganismo está presente em grande número no ambiente (ARCHER & MORETTO, 1994).

Revisão bibliográfica

O pescado representa a principal fonte de proteína animal na dieta alimentar em muitos países. É crescente o número de pessoas que preferem consumir a carne de peixe como uma alternativa de alimentação saudável em relação a outras carnes. Além de fatores culturais de cada lugar, o baixo teor de gordura de muitas espécies de peixes, o melhor valor nutritivo devido às suas proteínas e vitaminas e os efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados são aspectos importantes para a escolha do pescado na alimentação, ainda mais nos países em desenvolvimento onde se tenta reduzir a mortalidade por doenças cardiovasculares (TEIXEIRA & GARCIA, 2014).

As proteínas encontradas no peixe são consideradas de elevado valor biológico, possuem na sua composição todos os aminoácidos essenciais. Estas proteínas são excelentes fontes de lisina, metionina e cisteína. O conteúdo lipídico dos peixes, normalmente, tem uma reduzida percentagem de ácidos saturados e um elevado nível de polinsaturados dos quais se salientam os da série ômega-3 de cadeia longa (LC n-3 PUFA). O pescado é uma das únicas fontes que contém quantidades substanciais de ômega-3 em especial os ácidos docosaheptaenóico (ADH) e eicosapentaenóico (AEP) (LOPES, 2009).

O consumo *per capita* do pescado vem aumentando bastante nas últimas décadas, sendo que a média mundial permanece em torno de 16 quilos por pessoa ao ano, bem acima da média no Brasil (7 kg/pessoa/ano), onde a carne de peixes representa apenas 5% do total de carnes consumidas no país. No Brasil, esse baixo índice de consumo, deve-se principalmente à baixa disponibilidade do pescado em grandes quantidades e ao costume cultural, onde o pescado é consumido somente em algumas datas comemorativas, uma porção considerável da população não tem o hábito de consumir pescado frequentemente (SOARES & GONÇALVES, 2012).

Micropogonias furnieri (corvina) é considerada, devido à sua abundância, uma das mais tradicionais e importantes espécies da pesca brasileira, tendo sido capturadas 44.059,5 toneladas na costa brasileira em 2007 (TEIXEIRA et al. 2009). Constitui uma das espécies de maior captura principalmente no litoral do Atlântico Sul, representando em torno de 24,02% do desembarque total de pescado no Estado do Rio Grande do Sul em 2004

(BONANCINA & QUEIROZ, 2007). Por ser uma das espécies mais empregadas na dieta das populações costeiras, torna-se, portanto, imprescindível o conhecimento da sua qualidade para o consumo (NORBIS, 1995).

2.1 Contaminação de pescados

Apesar de ser um alimento considerado saudável, o pescado é altamente perecível, possui pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água e alto teor de nutrientes facilmente utilizáveis por micro-organismos, necessitando de condições higiênico-sanitárias adequadas desde a sua captura até a comercialização. Para a conservação do pescado são necessários métodos adequados com a finalidade de diminuir o processo de deterioração e a contaminação do alimento por microrganismos patogênicos, de forma a mantê-lo com características de alimento fresco e seguro até o fim do prazo de validade (GOMES, 2009).

Os pescados, quando obtidos ou armazenados em condições higiênicas inadequadas, podem ser contaminados por agentes patogênicos como vírus e bactérias, responsáveis por causar diversas doenças nos seres humanos (BARTOLOMEU et al., 2011). Dependendo do microrganismo, o pescado pode ser contaminado inclusive no ambiente em que vive, como ocorre, por exemplo, com *Vibrio parahaemolyticus*. Boas Práticas de Fabricação (BPF) são utilizadas para melhor conservação e melhorar a segurança dos pescados. Baseiam-se em uma série de procedimentos e cuidados que envolvem higiene do manipulador, das instalações e dos utensílios, uso de gelo de qualidade e em quantidade adequada; controle de tempo e temperatura de manuseio, armazenamento e transporte; controle de pragas, animais domésticos e contaminantes, entre outros (CODEX, 2003).

No Brasil, ainda não há regimento específico relacionado a Boas Práticas para barcos pesqueiros artesanais. Geralmente o pescador artesanal manipula o pescado a bordo, realizando a lavagem, separação por espécie e tamanho, faz uso de gelo e utiliza equipamentos como caixas e pás para transferência do produto (MACHADO et al., 2010).

Um amplo grupo de microrganismos pode estar associado à contaminação de pescados, bem como por resíduos de produtos químicos, como metais pesados (mercúrio, cádmio e chumbo são os mais frequentes encontrados) através de águas contaminadas ou poluídas dos estuários e das bacias pesqueiras. O pescado vivo apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal. Desta forma, a manipulação indevida e a não observância de medidas higiênicas podem facilitar o desenvolvimento dos patógenos, presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente (SANTIAGO et al., 2013).

Os microrganismos encontrados em pescados e em produtos relacionados podem ser divididos em três grupos: 1) bactérias que podem estar naturalmente presentes no habitat de espécies consumidas, como *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*), *Clostridium botulinum* não proteolítico tipo B, E e T, *Plesiomonas shigelloides* e *Aeromonas* spp.; 2) bactérias presentes no ambiente em geral (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium* proteolítico botulínico tipo A e B, *Clostridium perfringens* e *Bacillus* spp.); 3) bactérias que têm seu habitat natural no homem ou nos animais (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* e *Staphylococcus aureus*) (HUSS et al., 1997).

Em estudo realizado por Pereira et al. (2007), foram analisadas 86 amostras de *Perna perna* (mexilhões) *in natura* e pré-cozidos. *Vibrio* spp. foi detectado em 33 (73,2%) de amostras coletadas no Rio de Janeiro, Brasil. Milan et al. (2015) também pesquisaram *V. parahaemolyticus* em pescados, estes capturados na Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. Foram analisadas 56 amostras e o microrganismo foi isolado de três espécies de pescados: *Mugil platanus* (tainha), *Paralichthys orbignyanus* (linguado) e *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa), demonstrando a ocorrência do patógeno em pescados capturados nesta região.

Nos Estados Unidos, no período entre 1999 a 2006, o pescado foi responsável por 1.140 casos de surtos alimentares. Peixes estiveram envolvidos em 694 casos, enquanto os *Mollusca* (moluscos), incluindo *Ostrea edulis* (ostras) e *Mytilus edulis* (mexilhões), em 175 surtos. De acordo com o Center for Science in the Public Intesres (CSPI) um quilo de peixe e marisco

tem 29 vezes mais probabilidade de causar DTA do que a categoria de alimento considerada mais segura, os alimentos lácteos (BARRETO-EVANGELISTA et al., 2017).

De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) dos Estados Unidos, os peixes e mariscos se encontram envolvidos em 5% dos casos individuais e em 10% de todos os surtos de DTA no Brasil. No período de 1999 a 2008, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde relatou que dos 6.602 surtos notificados no Brasil, o pescado esteve envolvido em 69 deles. Apesar da subnotificação, estima-se que os custos com casos de intenção por DTA no período foram de 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano (BARRETO et al., 2012).

Estima-se que ocorram em torno de 80 mil casos de infecção por *Vibrio* por ano nos Estados Unidos e cerca de 50 mil desses casos seja pela ingestão de alimentos contaminados. A espécie relatada mais frequentemente é o *Vibrio parahaemolyticus*, sendo responsável por 45 mil doenças por ano nos Estados Unidos (CDC, 2016).

2.2 *Vibrio* spp

Vibrio é um gênero bacteriano que habita ambientes aquáticos e está presente em todo o mundo. Ambientes de água salgada podem ser propícios ao crescimento desses microrganismos, incluindo os patogênicos aos humanos. São bacilos não formadores de esporos, finos ou com uma única curvatura rígida. São móveis e muitos têm um único flagelo polar quando se desenvolvem em meio líquido (SANTIAGO et al., 2013). O gênero inclui pelo menos 12 espécies patogênicas para o homem, 10 das quais podem ser transmitidas por alimentos (SANTOS & VIEIRA, 2013).

Contagens elevadas de *Vibrio* em pescados têm sido vistas como uma ameaça para os animais cultivados/capturados e para os seres humanos que os consomem. Um fator agravante é a resistência a antibacterianos que vem sendo encontrada nos isolados de pescados, causada pelo uso indiscriminado de antibióticos (SANTIAGO et al., 2013). No estudo realizado por Silveira et al. (2018), concluiu-se que a maioria dos isolados da espécie *V. vulnificus* obtidos de pescado capturados do estuário da Lagoa dos Patos eram multirresistentes.

As doenças causadas por bactérias patogênicas do gênero *Vibrio* podem ser divididas em dois grupos principais: cólera e infecções não coléricas. *V. cholerae* é o agente etiológico da cólera, uma doença diarreica grave, que geralmente é causada pela ingestão de alimentos ou água contaminados, embora a transmissão pessoa a pessoa também seja possível.

As infecções não coléricas podem ser causadas por *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, acarretando um grupo de infecções com diferentes manifestações clínicas dependendo da espécie do patógeno, via de infecção e susceptibilidade do hospedeiro. A ingestão de bactérias que não são da cólera pode causar gastroenterite leve ou septicemia primária, enquanto a exposição de lesões na pele à água contaminada pode causar infecção da ferida que pode resultar em septicemia secundária (AUSTIN et al., 2018).

2.2.1 *Vibrio parahaemolyticus*

A bactéria *V. parahaemolyticus* é um bacilo Gram-negativo, halofílico, anaeróbico facultativo, pertencente à família *Vibrionaceae* (SANTIAGO et al., 2013). É encontrado vivendo livremente em ambiente marinho e águas estuarinas. Em meses de inverno, quando as temperaturas da água são desfavoráveis pode ser indetectável (BROBERG et al., 2011). Esta bactéria é frequentemente isolada de uma variedade de pescados, como *Gadus morhua* (bacalhau), *Sardinella brasiliensis* (sardinha), *Scomber scombrus* (linguado), Mollusca (molusco), entre outros. *V. parahaemolyticus* pode levar ao desenvolvimento de doença aguda, causando gastroenterite caracterizada por diarreia, dor de cabeça, vômitos, náuseas, cólicas abdominais e febre baixa (SU & LIU, 2007).

Com base em estudos de laboratório, *V. parahaemolyticus* pode crescer em concentrações de cloreto de sódio variando de 0,5% a 10%, com níveis ideais entre 1% e 3%. As concentrações de salinidade encontradas por *V. parahaemolyticus* em ambientes marinhos variam entre 0,8% e 3% (YEUNG & BOOR, 2004).

No Japão, *V. parahaemolyticus* é responsável por 20 a 30% de todos os casos de infecção alimentar. A alta taxa de infecção neste país é atribuída à

dieta rica em frutos do mar, bem como à prática comum de comer pescados crus (BROBERG et al., 2011).

No Brasil, em 2002, foram relatados 26 casos de infecção por *V. parahaemolyticus* entre os hóspedes de dois hotéis no Ceará e *V. parahaemolyticus* foi encontrado em 45% deles, porém a bactéria não foi isolada a partir de amostras de alimento (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Rosa et al. (2016) analisaram 130 peixes capturados no estuário da Lagoa dos Patos, sendo 65 inteiros e 65 eviscerados. Foram realizadas pesquisas quanto à presença de *V. parahaemolyticus* e o microrganismo foi isolado de três (4,61%) amostras de peixes inteiros e de três (4,61%) amostras de peixes eviscerados. Foi o primeiro relato de isolamento de *V. parahaemolyticus* em *M. furnieri*, salientando a necessidade de medidas de controle eficientes deste microrganismo em pescados.

2.3 Utilização do óleo essencial de *O. vulgare* para controle microbiano em pescados

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 (SOUZA et al., 2019).

A qualidade e a segurança dos alimentos se tornaram uma das principais preocupações dos consumidores, produtores, indústrias alimentícias e agências regulatórias em todo o mundo. Essas tendências recentes podem ser devidas à globalização do comércio de alimentos e mudanças nos hábitos alimentares e comportamento dos consumidores, como o aumento da demanda por produtos naturais, frescos, minimamente processados, de fácil preparo e prontos para comer (HASSOUN e ÇOBAN, 2017).

No entanto, a preocupação com a segurança na adição de conservantes químicos e sintéticos vem crescendo, sendo maior a procura por mecanismos alternativos baseados no uso de compostos naturais (HASSOUN e ÇOBAN,

2017). Os óleos essenciais (OE) 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 e JO, 2013).

Os OEs são muito utilizados no preparo de alimentos em virtude do sabor e aroma diferenciados, proporcionando o aumento da vida de prateleira do produto quando capazes de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e consequente deterioração dos alimentos. São extraídos de plantas aromáticas e medicinais, podendo ser obtidos de diversas partes das plantas como folhas, flores, sementes, raízes, cascas e tubérculos (SILVA et al., 2012).

Várias plantas podem ser usadas para extração de OE, como *Origanum vulgare* (orégano), *Eugenia caryophyllata* (cravo), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Mentha piperita* (hortelã), *Cuminum cyminum* (cominho), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Ocimum basilicum* (manjericão), *Zingiber officinale* (gengibre), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Cymbopogon nardus* (citronela) *Coriandrum sativum* (coentro), entre outras (POMPO et al., 2018).

O óleo essencial de *O. vulgare* foi reconhecido por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, devido ao seu alto conteúdo fenólico (carvacrol, carvacrol éter metílico e éter metil timol). O carvacrol tem capacidade penetrar nas membranas celulares devido à sua natureza lipofílica (GURDIAN et al., 2017).

A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão. Alguns apresentam ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e também sobre leveduras e fungos filamentosos (OLIVEIRA et al., 2006).

Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia proposta pelo NCCLS não pode ser seguida à risca, devido às propriedades químicas que estes apresentam. Dessa forma, feitas modificações, esses métodos

podem ser usados em testes de verificação de atividade antimicrobiana. Na maioria dos estudos, as zonas de inibição formadas pelos óleos são comparadas com aquelas obtidas pelos antibióticos, no entanto, é importante destacar que esses resultados não devem ser simplesmente comparados, pois as particularidades apresentadas pelos óleos e outras variáveis, como a técnica usada, o meio de crescimento, o microrganismo teste, devem ser levadas em consideração (NASCIMENTO et al., 2007).

Em estudo realizado por Mexis et al. (2009), foi adicionado óleo essencial de *O. vulgare* sobre a superfície de filés de *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris) e foi verificada a diminuição nas contagens de microrganismos indesejáveis, aumentando a vida útil dos filés em 7-8 dias. Goulas e Kontominas (2007) também verificaram que a adição de óleo essencial de *O. vulgare* atrasou a deterioração de filés salgados de *Sparus aurata* (dourada). Mello et al. (2018) estudou o efeito de *O. vulgare* no controle de *V. parahaemolyticus* e de *V. vulnificus* em filés de *M. platanus*. Filés contaminados experimentalmente foram marinados em soluções com óleo essencial de *O. vulgare*. Efeito bactericida foi observado quando a concentração de óleo na solução foi de 1,5%. Van Haute et al. (2016) também marinaram produtos à base de peixe em óleo essencial de *O. vulgare* e mesmo em baixa concentração (1%) os óleos mostraram potencial para diminuir a população de coliformes totais, leveduras, bactérias ácido lácticas e bactérias psicrotróficas aeróbicas.

2.4 Cobertura Comestível

A cobertura comestível é definida como uma camada de material comestível formada ao redor do alimento ou colocada entre os componentes do mesmo (BERBARI et al., 2011). Podem ser classificados em comestíveis ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para sua produção e da quantidade das substâncias empregada (FAKHOURI et al., 2007).

As coberturas comestíveis são aplicadas ou formadas diretamente sobre a superfície do alimento, configurando membranas delgadas, imperceptíveis a olho nu e com diversas características estruturais, que são dependentes da formulação da solução filmogênica precursora. Como estas coberturas passam

a fazer parte do alimento a ser consumido, os materiais empregados em sua formação devem ser considerados como GRAS (Generally Recognized as Safe), ou seja, não serem tóxicos e serem considerados seguros para o uso em alimentos (U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA, 2013).

Os materiais empregados na formação das coberturas podem ter origem animal ou vegetal, ou formarem um composto com a combinação de ambas. As coberturas empregadas podem ser hidrofóbicas ou hidrofílicas. As coberturas hidrofílicas são mais indicadas para superfícies fatiadas, frutas com aspectos brilhantes que apresentem alta molhabilidade. Já as formulações hidrofóbicas, são indicadas para o revestimento de frutas com alta taxa de transpiração, nas quais a degradação ocorre essencialmente por perda de água, levando a desidratação e alteração do aspecto superficial (ASSIS & BRITTO, 2014).

Os biopolímeros normalmente mais utilizados na elaboração de filmes e coberturas comestíveis são as proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares), os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectinacelulose e seus derivados, alginato e carragena) e os lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, cera e ésteres de ácido graxo) ou uma combinação deles. As coberturas também podem servir como matrizes para a incorporação de aditivos como aromas, antioxidantes, conservantes e óleos, melhorando as características sensoriais e a estabilidade dos produtos (WALTER et al., 2010).

Dentre os materiais pesquisados e aplicados para a produção de coberturas, o amido se destaca, em razão de ser abundante na natureza, renovável, de baixo custo de produção e capaz de formar matriz contínua. A aplicação da cobertura de amido na superfície de alimentos funciona como barreira contra a perda de água e liberação de CO₂ pelo aumento da espessura da cutícula. As coberturas elaboradas a partir de polissacarídeos constituem boas barreiras a gases, contribuindo para o controle do processo respiratório, tendo também efeitos antimicrobianos, porém são sensíveis à umidade e apresentam alta permeabilidade ao vapor de água (PRATES & ASCHERI, 2011).

2.5 Atividade antimicrobiana de cobertura incorporada com óleos essenciais

A literatura científica na área da ciência e tecnologia de alimentos tem mostrado um enfoque no estudo do potencial antimicrobiano das especiarias, considerando a sua inclusão nos sistemas de bioconservação de alimentos. A produção de coberturas com atividade antimicrobiana tem como objetivo a redução ou inibição do crescimento de microrganismos presentes principalmente na superfície do alimento, onde ocorre a maior parte das reações de deterioração (AYALA-ZAVALA et al., 2009).

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. O objetivo é preservar as propriedades nutricionais e qualidade sensorial, bem como manter sua segurança microbiológica. Segundo Cutter (2006), agentes antimicrobianos, quando são incorporados em coberturas/filmes, podem ser eficazes para reduzir o número de microrganismos de origem alimentar.

Os agentes antimicrobianos mais utilizados em coberturas para alimentos são ácidos orgânicos, quitosana, nisina, lactoperoxidase, extratos e óleos essenciais de plantas (MAZZUCATO, 2013). Oliveira (2017) fez uso de cobertura à base de quitosana combinada com óleo essencial de *Salvia sclarea* em morangos e observou que esse tratamento foi eficaz para a redução de mesófilos e bolores e leveduras, preservando as características sensoriais e nutricionais, e as condições de higiene. Duarte (2016) utilizou a cobertura comestível de gelatina com óleo essencial de *Cinnamomum cassia* (canela) em *Solanum lycopersicum var. cerasiforme* (tomate cereja) e observou que a cobertura com o óleo foi eficaz para reduzir a contagem de mesófilos aeróbicos ao longo dos dias de armazenamento.

Estudos como esses, aliados à alta demanda dos consumidores por produtos naturais e sem conservantes, têm dado destaque ao uso de coberturas contendo óleos essenciais na promoção da qualidade dos alimentos (FILHO, 2015).

3. Hipótese

O óleo essencial de *O. vulgare* associado à cobertura de amido é capaz de inibir a multiplicação de *V. parahaemolyticus* em filés de *M. funieri*.

4. Objetivos

4.1 Geral

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*.

4.2 Específicos

- 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. funieri*;
- 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. funieri*.

5. Material e métodos

5.1 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.

5.2 Cepas bacterianas

As cepas de *V. parahaemolyticus* utilizadas no disco-difusão foram ATCC 8001 e duas cepas previamente isoladas de *M. funieri* (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.

5.3 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).

5.4 Aplicação no produto

5.4.1 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 10^3 UFC/mL foi colocado em sacos estéreis contendo os 10 g do pescado, obtendo-se a concentração final de 10^1 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.

5.4.2 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.

5.4.3 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 semeados 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.

5.4.3.1 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 et al.
<i>ToxR-b</i>	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG		(1999)

5.6 Análise estatística

Foram aplicados 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*.

6. Resultados

6.1 Disco-difusão

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.

6.2 Contaminação experimental

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.

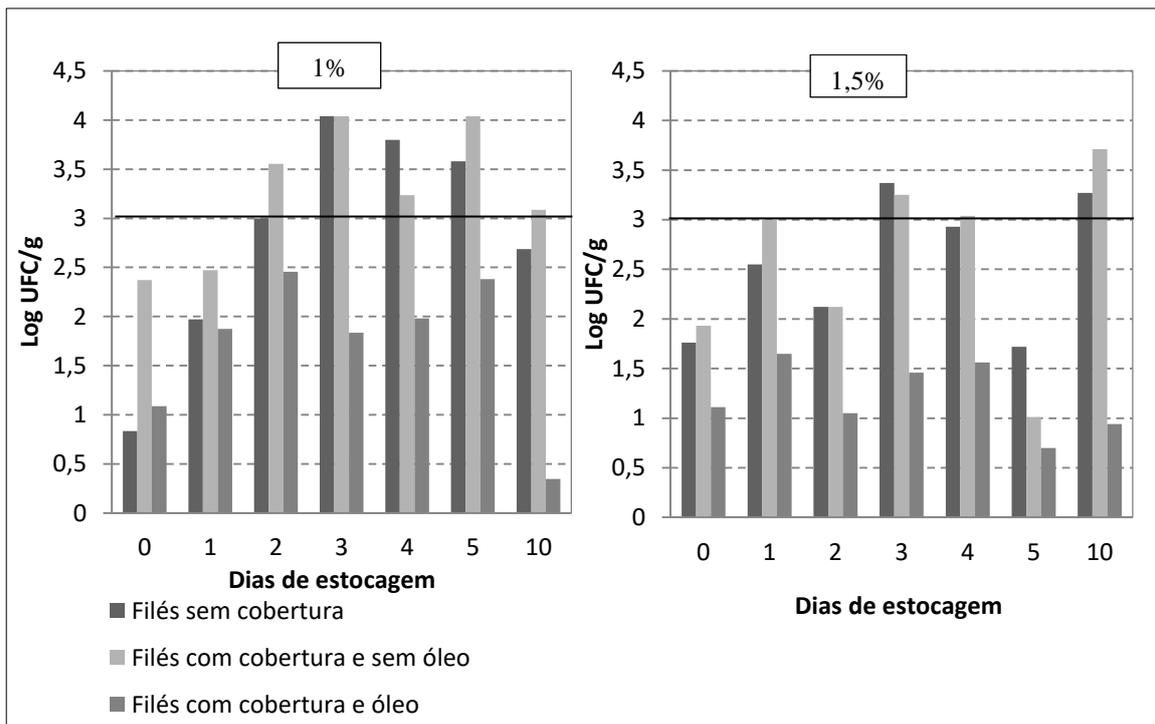


Figura 1. Contagens de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri* experimentalmente contaminados cobertos com película de amido contendo 1% e 1,5% de óleo de *Origanum vulgare*, armazenados a 4°C. A linha contínua marca o limite aceitável para a contagem de *V. parahaemolyticus* em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

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).

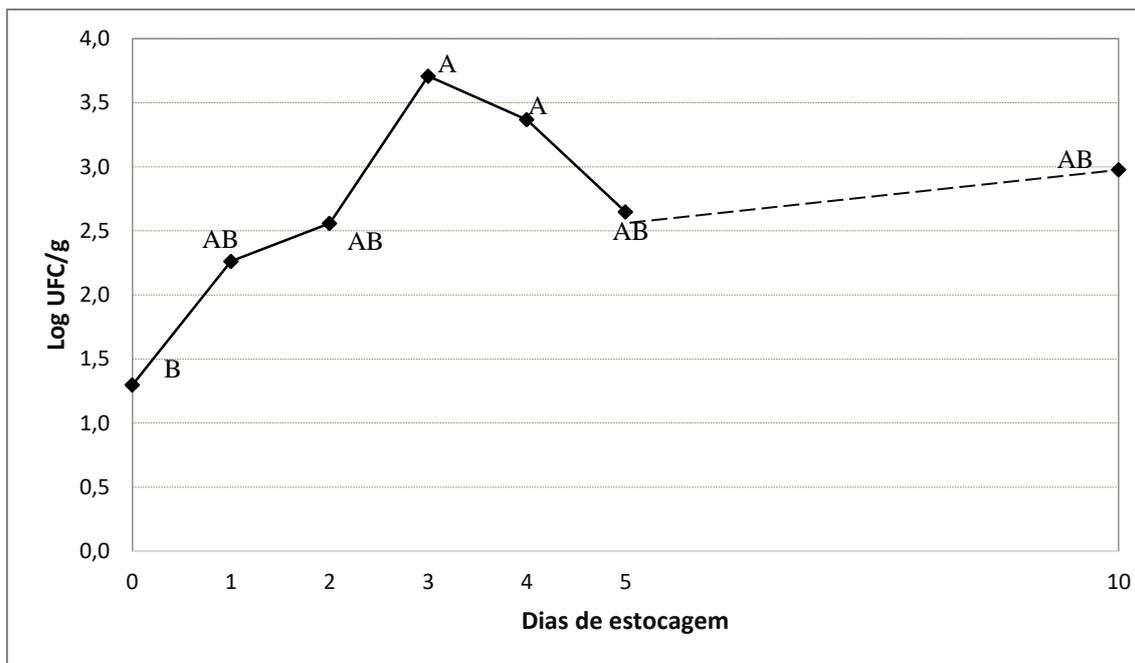


Figura 2. Comportamento de *Vibrio parahaemolyticus* em filés de *Micropogonias furnieri* experimentalmente contaminados (média de seis repetições). Médias com as mesmas letras são estatisticamente iguais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

7. 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. Outros estudos têm constatado a ação antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* (Goulas e Kontominas, 2007; Mexis et al., 2009; Santos et al., 2012; Santurio et al., 2007; Van Haute et al., 2016), porém frente a outros microrganismos que não *V. parahaemolyticus*.

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 10³ 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. funieri*, 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. Kanek & 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 higiênico 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 & REZENDE, 2009).

8. 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.

8. Referências bibliográficas

ARCHER, R. M.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em Mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus, 1758) de Banco Natural do Litoral do Município de Palhoça, Santa Catarina, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 379-386, 1994.

ARAÚJO, D. A. F. V.; SOARES, K. M. P.; GÓIS, V. A. Características gerais, processos de deterioração e conservação do pescado. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 4, n. 9, e. 114, p. 771, 2010.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014.

BAKER-AUSTIN, C. B.; OLIVER, J. D.; ALAM, M.; ALI, A.; WALDOR, M. K.; QADRI, F. URTAZA, J. M. *Vibrio* spp. Infections. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2018.

AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, L. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal Food Science**, v. 74, n. 7, p. 84-91, 2009.

BARRETO, N. S. E.; MOURA, F. C. M.; TEIXEIRA, J. A.; ASSIM, D. A.; MIRANDA, P. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado comercializados no município de Cruz das Almas, Bahia. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 86-95, 2012.

BARRETO-EVANGELISTA, N. S.; DAMACENA, S. S.; CARDOSO, L. G.; MARQUES, V. F., SILVA, I. P. Condições higiênicos sanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em Cachoeira, Bahia. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.11, n.1, p. 60-74, 2017.

BARTOLOMEU, D. A. F. S.; DALLOBONA, B. R.; MACEDO, R. E. F.; KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante o processamento de filé de tilápia. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.1, p. 21-30. 2011.

BERBARI, S. A.G.; PRATI, P.; FREITAS, D. G. C.; ORMENESE, R. C. S. C.; FAKHOURI, F. M. Utilização de coberturas comestíveis para redução de absorção de gordura em produtos estruturados pré-fritos congelados de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 172-180, 2011

BEUCHAT, L. R. Interacting Effects of pH, Temperature, and Salt Concentration on Growth and Survival of *Vibrio parahaemolyticus*. **Applied Microbiology**, p. 844-846, 1973.

BILUNG, M. L.; RADU, S.; BAHAMAN, R. A.; RAHIM, A. R.; NAPIS, S.; KQUEEN, Y. C.; MURUGAIAH, C.; HADI, A. Y. Random amplified polymorphic

DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from local cockles (*Anadara geanosa*). **American Journal of Immunology**, v. 1, p. 31-36, 2005.

BIZZO, H. R.; HOVEL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 588-594, 2009.

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**, 10 jan 2001; Seção 1.

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**, 20 dez 2019; Ed. 249; Seção 1; Pag. 133.

BROBERG, C. A.; CALDER, T.; OTRH, K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. **Microbes and Infection**, v.13, p. 992, e. 1001, 2011.

BONACINA, M.; QUEIROZ, M. I. Elaboração de empanado a partir da corvina (*Micropogonias furnieri*). **Revista ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3, p. 544-552, 2007.

CALLIARI, L. J. O ambiente e a biota do Estuário da Lagoa dos Patos. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J. P. **Os ecossistemas costeiro e marinho do extremo sul do Brasil**. Rio Grande: Ecoscientia, p.13-18, 1998.

CAROVIC-STANKO, K.; ORLIC, S.; POLITEO, O.; STRIKIC, F; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTES-RES–CSPI. **Fish & shellfish top CSPI outbreak List**. Disponível em: < <https://cspinet.org/topics/e-coli?page=4>>. Acesso em: 01 mar. 2021.

Centro Norte Americano para Controle e Prevenção de Doenças (CDC). Disponível em: < <https://www.cdc.gov/>>. Acesso em: 01 mar. 2021

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M02-A11 performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**, Wayne, Pennsylvania, USA, p. 950, 2012.

CODEX, 2003 **Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros**, CAC/RCP 52, 146 p. Disponível em: http://www.fao.org/tempref/codex/Publications/Booklets/Practice_code_fish/CC_FFP_2012_ES.pdf . Acesso em: 28 junho, 2020.

COSTA, A. L. P.; NASCIMENTO, J. F.; JÚNIOR, A. C. S. S. Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) comercializada em feira pública. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.12, n.5, p.1-6, 2018.

CUTTER, N. C. Opportunities for bio-based packaging Technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 131-142, 2006.

DADISMAN, T. A.; NELSON, R.; MOLEND, J. R. & GARBER, H. J. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: clinical and epidemiologic aspects. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 36, p. 111-112, 1973.

DUARTE, S. F. Cobertura comestível com óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*) em tomates cereja (*Solanum lycopersicum var. cerasiforme*). Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 2016.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Revista ciência e tecnologia de alimentos**, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.

FILHO, R. D. O. **Incorporação do óleo essencial de manjeriço em filmes biodegradáveis à base de galactomanana de óleo de canola**. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE, 2015.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Investigação de surto de gastroenterite por *Vibrio parahaemolyticus* em Fortaleza/Ceará. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.4, p.5-7, 2002.

GOMES, D. A. V. **Identificação de microorganismos presentes nos pescados nos compartimentos de armazenamento de embarcações**. Dissertação (Microbiologia Ambiental). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2009.

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. **Food Chemistry**, v. 100, p. 287-296, 2007.

GURDIAN, C.; CHOULJENKO, A.; SOLVAL, K. M.; BOENEKE, C.; KING, J. M.; SATHIVEL, S. Application of Edible Films Containing Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oil on Queso Blanco Cheese Prepared with Flaxseed (*Linum usitatissimum*) Oil. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 6, 2017.

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

HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**. n. 8, p. 91-8, 1997.

JAYASENA, D. D.; JO, C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 34, p. 96 – 108; 2013.

Kaneko, T., and R. R. Colwell. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. **Jornal of Bacteriology**. n. 113, p. 24-32, 1973.

KAYSNER, C.A.; DEPAOLA Jr, A. *Vibrio*. U.S. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**, Chap. 9, 2004. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-vibrio>>. Acesso em: 19 maio 2020.

LOPES, A. M. R. M. **Avaliação da contaminação em metais pesados no pescado: Análise da situação do pescado comercializado em Portugal e dos alertas emitidos pelo sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2009.

MACHADO, T. M.; FURLAN, E. F.; NEIVA, C. R. P.; CASARINI, L. M.; PÉREZ, A. G. A.; NETO, M. J. L.; TOMITA, R. Y. Fatores que afetam a qualidade do pescado na pesca artesanal de municípios da costa sul de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 3, p. 213 – 223, 2010.

MAZZUCATO, C. **Caracterização do potencial de filmes de pvc dopado com óleo essencial de alecrim para o controle microambiental em embalagens de alimentos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourado – MS, 2013.

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***. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

MEXIS, S.F.; CHOULIARA, E.; KONTOMINAS, M.G. Combined effect of anoxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 C. **Food Microbiology**, v. 26, p. 598-605, 2009.

MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S. ROSSONI, D. F.; CARSOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais

contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p.18-24, 2014.

MILAN, C.; SILVEIRA, D. R.; ROSA, J. V.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 74, n. 2, p. 149-53, 2015.

MOHANTY, B. P.; MAHANTY, A.; GANGULY, S.; MITRA, T.; KARUNAKARAN, D.; ANANDA, R. Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 10835–10847, 2013.

MUDOH, F. M.; PARVEEN, S.; SCHWARZ, J.; RIPPEN, T.; CHAUDHURI, A. The effects of storage temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and organoleptic properties in oysters. **Frontiers on Public Health**, v. 2 p. 1-7, 2014.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, 2007.

NORBIS, W. Influence of wind, behaviour and characteristics of the croaker (*Micropogonias furnieri*) artisanal fishery in the Rio de la Plata (Uruguay). **Fisheries Research**, n. 22, p. 43-58, 1995.

OLIVEIRA, J. F. **Cobertura comestível de quitosana adicionada de óleo essencial de *Sálvia esclareaia* na conservação de morangos**. Trabalho de conclusão de curso. (Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Campo Mourão, 2017.

PRATES, M. F. O.; ASCHERI, D. P. R. Efeito da cobertura de amido de frutade-lobo e sorbitol e do tempo de armazenamento na conservação pós-colheita de frutos de morango. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 29, n. 1, p. 21-32, jan./jun. 2011.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. isolados a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos de Estação Experimental de Cultivo, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 387-390, 2007.

ROSA, J. V.; SILVA, C. J.; BARBOSA, F.; BAIRROS, J. DUVAL, E. H.; HELBIG, E.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolates in fish species captured from the Lagoa dos Patos estuary. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 3, p. 1345-1354, 2016.

POMPO, J. C. P.; RIBEIRO, E. R.; PINTO, R. L.; SILVA, B. J. M. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias

contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.

REIS, E. G. **Pesca artesanal na Lagoa dos Patos**: História e administração pesqueira. In: ALVES, F.N. Por uma história multidisciplinar do Rio Grande. Rio Grande: FURG, p. 81-8, 1999.

RHAYOUR, K, BOUCHIKHI, T, TANTAOU-ELARAKI, A.; SENDIDE, K.; REMMAL, A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, n. 15, p. 356-362, 2003.

ROSA, J. V.; SILVA, C. J.; BARBOSA, F.; BAIROS, J.; DUVAL, E. H.; HELBIG, E.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* isolates in fish species captured from the Lagoa dos Patos estuary. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1345-1354, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**: A Laboratory Manual. 3^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 999, 2001.

SANTIAGO, J. A. S.; ARAÚLO, P. F. R.; SANTIAGO, A. P.; CARVALHO, F. C. T.; VIEIRA, R. H. S. F. Pathogenic bacteria related to ingestion of fish – A review. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 46, n. 2, p. 92–103, 2013.

SANTOS, C. A. M. L.; VIEIRA, R. H. S. F. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina**, v. 55, n. 4, p. 219-28, 2013.

SILVA, W. B.; SOUSA, C. L. L.; ARAUJO, C. S.; NASCIMENTO, V. H. A.; LOURENÇO, L. F. H. Propriedades tecnológicas e antimicrobiana de biofilmes de proteínas de peixe com óleo essencial de cravo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.14, n.2, e. 5642, 2019.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.

SOUSA, R. S. **Influência da concentração de óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) nas propriedades de filmes à base de Hidroxpropilmetilcelulose (HPMC)**. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2016.

STROM, M. S.; PARANJPYE, R. N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. **Microbes and Infection**, n. 2, p.177–188. 2000.

SU, Y. I.; LIU, C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. **Food Microbiology**, v. 24, p. 549–558, 2007.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, n. 39, p. 639– 644, 2006.

SILVA, W. A. D.; PEREIRA, J.; CARVALHO, C. W. P. D.; FERRUA, F. Q. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 154-163, 2007.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia de planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, p. 1002, 2004.

TAVARES, F. O.; PIERETTI, G. G.; ANTIGO, J. L.; POZZA, M. S. S.; SCAPIM, M. R.; MADRONA, G. S. Cobertura comestível adicionada de óleo essencial de orégano e alecrim para uso em ricota. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 4, p. 249-257, 2014.

TEIXEIRA, L. C.; GARCIA, P. P. C. Qualidade do pescado: captura, conservação e contaminação. **Acta de Ciências e Saúde**, n. 3, v. 2, 2014.

TEIXEIRA, M. S.; BORGES, A.; FRANCO, R. M.; CLEMENTE, S. C. S.; FREITAS, M. Q. Método de índice de qualidade (QIM): desenvolvimento de um protocolo sensorial para corvina (*Micropogonias furnieri*). **Revista Brasileira de Ciências Veteriárias**, v. 16, n. 2, p. 83-88, 2009.

VAN HAUTE, S.; RAES, K.; VAN DER MEEREN, P. Sampers a The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. **Food Control**, v. 68, p. 30-39, 2016.

WALTER, E. H. M.; FONTES, L. C. B.; OSAWA, C. C.; STEEL, C. J.; CHANG, Y. K. A influência de coberturas comestíveis na aceitação sensorial e intenção de compra de bolos de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 335-341, 2010.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HASS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. 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**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WU, W.; ZHOU, M.; ELE, H.; LIU, C.; LI, P.; WANG, H.; LIU, Y.; HAO, X., FANG, Z. A sensitive aptasensor for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 272, p. 550–558, 2018.

YAN, L.; PEI, X.; ZHANG, X.; GUAN, W.; CHUI, H.; JIA, H.; MA, G.; YANG, S.; LI, Y.; LI, N.; YANG, D. Occurrence of four pathogenic Vibrios in Chinese freshwater fish farms in 2016. **Food Control**, v. 95, p. 85-89, 2019.

YANG, Z.; JIAO, X.; LI, P.; PAN, Z.; HUANG, J.; GU, R. FANG, W. CHAO, G. Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon

meat as a function of temperature. **Food Microbiology**. v. 26, p. 606–614, 2009.

YEUNG, P. S. M.; BOOR, K. J. Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Foodborne *Vibrio parahaemolyticus* Infections. **Foodborne Pathogens and disease**. v. 1, n. 2, 2004.