

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

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*

Greyce Silveira Mello

Pelotas, 2018

Greyce Silveira Mello

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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Cláudio Dias Timm
Coorientadora: Natacha Deboni Cereser

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M527a Mello, Greyce Silveira

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* / Greyce Silveira Mello ; Cláudio Dias Timm, orientador ; Natacha Deboni Cereser, coorientadora. — Pelotas, 2018.

45 f.

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

1. Pescados. 2. Análise sensorial. 3. Aditivos naturais. 4. Orégano. 5. Manjeriço. I. Timm, Cláudio Dias, orient. II. Cereser, Natacha Deboni, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Greyce Silveira Mello

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 aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 26/02/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Dias Timm Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Nádia Carbonera Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Caroline Peixoto Bastos Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais, Alexandro Reis de Mello e Keila Fabiane Affonso da Silveira, por todos seus esforços para me garantir uma boa educação, pelo amor, por sempre acreditarem em mim e pelo apoio incansável para que eu pudesse realizar meus sonhos e planos. Se hoje estou aqui é por vocês.

Ao meu namorado e sua família, pelo amor, carinho e acolhimento, sendo meus grandes incentivadores desde a graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cláudio Dias Timm, por estar sempre disponível a ajudar, por todos os ensinamentos prestados e pela amizade.

À estagiária Rebeca Porto, pela ajuda, dedicação e companheirismo durante todo período do trabalho.

À família LIPOA-UFPel, pela ajuda, paciência, colaboração no trabalho e grandiosa amizade.

Obrigada a todos!

Resumo

MELLO, Greyce Silveira. **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. 45f.

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

Por possuir características que favorecem o desenvolvimento bacteriano, como atividade de água elevada, composição química, teor de gorduras insaturadas e pH próximo da neutralidade, o pescado é uma potencial fonte de doenças transmitidas por alimentos. Espécies do gênero *Vibrio* são comumente reportadas como agentes causadores de surtos alimentares associados ao consumo de pescados. Nos últimos anos, vem crescendo o interesse na utilização de óleos essenciais como possível alternativa natural ao uso de aditivos químicos sintéticos para garantia da segurança microbiológica dos alimentos. O objetivo desse trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum* frente a *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, assim como verificar sua aplicabilidade, como conservante, em filés de *Mugil platanus* e aceitação sensorial pelos consumidores. O efeito antimicrobiano *in vitro* foi analisado pelo teste de disco-difusão e concentração bactericida mínima (CBM). Filés de *M. platanus*, experimentalmente contaminados com isolados de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* foram marinados por 24 horas em solução com 1,0 % e 1,5 % de óleo essencial de *O. vulgare*. Para análise sensorial foram preparadas amostras marinadas em solução de 1,5 % de óleo de *O. vulgare* e oferecidas a 100 avaliadores não treinados. O óleo de *O. basilicum* não apresentou ação antimicrobiana nos testes de disco-difusão e CBM, já o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou halos em que as médias variaram entre 24,6 e 34,1 mm e a CBM ficou entre 3,9 e 15,6 $\mu\text{L/mL}$. Quando aplicado no produto, o óleo essencial de *O. vulgare* eliminou os microrganismos que foram inoculados experimentalmente. Na análise sensorial, amostras marinadas em 1,5 % de óleo essencial de *O. vulgare* obtiveram média de 68,22 de aceitação entre os consumidores. A utilização de óleos essenciais de *O. vulgare* em filés de *M. platanus* é uma alternativa no controle de microrganismos patogênicos como *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*.

Palavras-chave: pescados; análise sensorial; aditivos naturais; orégano; manjerição, tainha

Abstract

MELLO, Greyce Silveira. **Antimicrobial activity of the *Origanum vulgare* and *Ocimum basilicum* essential oils in opposite to *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* and its application in filets of *Mugil platanus*.** 2018. 45f.

Dissertation (master degree in Science) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018

Because it has characteristics that favor bacterial development, such as high water activity, chemical composition, unsaturated fat content and pH close to neutrality, fish is a potential source of foodborne diseases. Species from the gender *vibrio* are commonly reported as causative agents of foodborne disease outbreaks related to the consumption of fish. In the last few years, the interest in using essential oils as a possible natural alternative to the use of synthetic chemical additives to ensure the microbiological safety of the food, have been growing. The objective of this work was to verify the antimicrobial activity in vitro from the essential oils of *Origanum vulgare* and *Ocimum basilicum* in opposite to *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* as verifying its applicability on *Mugil. Platanus*' filet and sensorial acceptance by the consumers. The antimicrobial effect in vitro was analyzed by the disk-diffusion and minimum bactericidal concentration (MBC). *M. platanus* filets experimentally contaminated have been marinated for 24 hours in solution with 1,5 % of *O. vulgare* essential oil. For sensory analysis, samples marinated in 1.5% *O. vulgare* oil solution were prepared and offered to 100 untrained evaluators. For sensory analysis, samples marinated in 1.5% *O. vulgare* oil solution were prepared and offered to 100 untrained evaluators. The *O. basilicum* oil has not presented antimicrobial action on the disk-diffusion and MBC tests. Nevertheless, the *O. vulgare* essential oil has presented halos in which the average numbers varied between 24,6 and 34,1 mm and the MBC varied between 3,9 and 15,6 $\mu\text{L/mL}$. When it was applied in the product, the *O. vulgare* essential oil eliminated the microorganisms that were inoculated the experimentally. In the sensorial analysis, samples marinated in 1,5 % of *O. vulgare* essential oil obtained na average of 68,22 of acceptance among the consumers. The use of essential oils of *O. vulgare* in *M. platanus* filets is an alternative to control the pathogenic microorganisms such as the *V. vulnificus* and the *V. parahaemolyticus*.

Keywords: fish; sensorial analysis; natural aditives; oregano; basil; mullet

Lista de Figuras

Figura 1	Teste da aplicação da ficha hedônica para filé de <i>M. platanus</i> marinado em óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	24
Figura 2	Teste de intenção de compra para filé de <i>M. platanus</i> marinado em óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	25

Lista de Tabelas

Tabela 1	Tamanho dos halos (mm) de inibição do crescimento bacteriano frente aos óleos essenciais no teste de disco-difusão.....	20
Tabela 2	Concentração bactericida mínima ($\mu\text{L}/\text{mL}$) dos óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> , de <i>O. basilicum</i> e da mistura, em partes iguais, dos dois óleos.....	21

Sumário

1	Introdução.....	8
2	Revisão da Literatura.....	11
3	Material e Métodos.....	16
3.1	Obtenção dos óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> e <i>O. basilicum</i>.....	16
3.2	Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>.....	16
3.3	Aplicação em filés de <i>M. platanus</i>.....	18
3.4	Análise sensorial.....	18
3.5	Comitê de ética.....	19
4	Resultados e discussões.....	20
4.1	Atividade anitimicrobiana <i>in vitro</i>.....	20
4.2	Aplicação do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> em filés de <i>M. platanus</i> experimentalmente contaminados.....	23
4.3	Análise sensorial.....	23
5	Considerações finais.....	27
	Referências.....	28
	Anexos.....	39

1 Introdução

Mugil platanus (tainha) é considerada o segundo recurso pesqueiro em importância econômica para os pescadores artesanais do estuário da Lagoa dos Patos, perdendo apenas para o *Farfantepenaeus paulensis* (camarão-rosa) (KALIKOSKI & VASCONCELLOS, 2013; BRASIL, 2015). Sua captura ocorre o ano todo no estuário e nas águas costeiras adjacentes e, quando a temporada de pesca do camarão fracassa, passa a ser o recurso mais importante para a economia local.

Os pescados são um alimento suscetível à deterioração microbiana devido à atividade de água elevada, composição química, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e pH próximo da neutralidade (pH 6,6-6,8), fatores que favorecem o desenvolvimento de bactérias (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Após a morte, a autólise se instala, tornando a superfície do corpo permeável às bactérias, ao mesmo tempo em que ocorre a liberação de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, entre outros, constituindo um excelente meio de cultivo para o crescimento bacteriano (MUKUNDAN et al., 1989, VIEIRA, 2004).

Vibrio é um gênero bacteriano de ambiente tipicamente marinho e estuarino e bactérias deste gênero são isoladas de peixes e crustáceos, sendo capazes também de se multiplicar livremente em águas marinhas (LIMA, 1997). Dentre as espécies patogênicas importantes para humanos, destacam-se o *Vibrio parahaemolyticus* e o *Vibrio vulnificus*.

V. parahaemolyticus é considerado um patógeno relevante nas regiões costeiras de clima temperado e tropical em todo o mundo (MARTINEZ-URTAZA et al., 2004). Este microrganismo tem sido responsável por casos de gastroenterites associadas ao consumo de peixes, moluscos e crustáceos do mar, crus ou mal cozidos (HEITMANN et al., 2005). As infecções por *V. vulnificus* em seres humanos são derivadas do consumo pescado ou da exposição à água contaminada, sendo esse patógeno responsável por grande parte das mortes relacionadas ao consumo e manipulação de pescados (JONES e OLIVER, 2009).

A busca por alimentos naturais tem se tornado uma grande preocupação para a indústria de alimentos, principalmente em relação ao uso de conservantes químicos, que podem às vezes ser substituídos por alternativas naturais, menos prejudiciais à saúde (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Alimentos com altos níveis de conservantes para redução da carga microbiana são indesejáveis e a pressão por parte dos consumidores se volta para maior produção de alimentos frescos que possuam conservantes naturais e com maior garantia de segurança (FORSYTHE, 2002).

Origanum vulgare (orégano) é um tempero utilizado na culinária para conferir sabor e aroma aos alimentos (KOKKINI e VOKOU, 1989), mas também possui características antioxidantes e antimicrobianas que aumentam sua vida de prateleira (ANSESIO et al., 2015). De acordo com Sivropoulou (1996), o óleo essencial de *O. vulgare* é rico em carvacrol, que possui ação antimicrobiana sobre bactérias patogênicas, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

Ocimum basilicum (manjeriço) tem sido utilizado na medicina por apresentar propriedades benéficas para a saúde, principalmente no tratamento de infecções no trato respiratório (AL ABBASY et al., 2015). De acordo com Silveira (2012), o óleo essencial de *O. basilicum* apresenta ação contra bactérias, como *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris* e *E. coli*. Linalol, 1,8-cineol e eugenol são citados como substâncias com atividade antibacteriana presentes no óleo essencial de *O. basilicum* (SOKOVIC et al., 2008).

São diversos os fatores responsáveis pela eficácia biológica dos óleos essenciais sobre os microrganismos patogênicos em alimentos, como temperatura, carga microbiana, pH, entre outros (BAJPAI et al., 2012). Portanto, os resultados obtidos em laboratório devem sempre ser testados no alimento (LEMAY et al., 2002), não só no sentido de verificar a atividade antimicrobiana no ambiente proporcionado pelo alimento, como também para verificar a aceitação sensorial do produto com os óleos essenciais pelos consumidores.

De acordo com Barbosa (2010), óleos essenciais com ação antimicrobiana têm potencial para serem utilizados em alimentos como aditivos naturais, porém seu uso deve ser pautado a níveis tolerados pelos consumidores, sendo necessários estudos sobre a aplicação de óleos essenciais de condimentos em alimentos e a sua aceitação deve ser testada.

Ainda são escassos os conhecimentos sobre os efeitos dos diferentes tipos de óleos essenciais sobre as espécies de *Vibrio*, sendo necessários mais estudos para o melhor entendimento dos efeitos de cada tipo de óleo para cada espécie de bactérias do gênero *Vibrio*. Além disso, a aplicabilidade dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos em alimentos à base de peixes ainda deve ser testada.

Baseado na hipótese de que os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum* possuem atividade antimicrobiana e que são promissores aditivos naturais para aplicação em pescados, o objetivo desse trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana destes óleos frente a *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, assim como verificar sua aplicabilidade em filés de *M. platanus* e aceitação sensorial pelos consumidores.

2 Revisão Bibliográfica

Os peixes da família Mugilidae, conhecidos como tainhas e paratis, são encontrados com frequência em águas marinhas, estuarinas e lagunares (MENEZES & FIGUEIREDO, 1985). São principalmente herbívoros, alimentando-se também de detritos e matéria orgânica (PAREJO, 1991). Na Lagoa dos Patos, juvenis de três espécies de Mugilidae são encontrados utilizando o estuário como área de criação e alimentação, porém somente os adultos de *Mugil platanus* são alvos da pesca (REIS et al., 1994; VIEIRA et al., 1998).

O pescado possui microbiota própria, que coexiste em equilíbrio biológico no peixe vivo (OGAWA e MAIA, 1999) e que reflete as condições microbiológicas do local onde foi capturado (MURATORI et al., 2004). Após a captura, o pescado também pode ser contaminado durante o transporte, manipulação, contato com superfícies, equipamentos e gelo contaminado, no ambiente de estocagem e na comercialização (HUSS, 1997).

Dentre as bactérias patogênicas associadas ao consumo de pescados e seus derivados destacam-se *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Escherichia coli* (NOVOTNY et al., 2004). Espécies de *Vibrio* são frequentemente isoladas de diferentes biótipos em todo o mundo, incluindo água do mar, pescados e também a partir de instalações de aquicultura (BAFFONE et al. 2000; XIE et al. 2005; SNOUSSI et al. 2006; LHAFI e KU'HNE 2007; COLAKOGLU et al. 2006).

Surtos de doenças causadas por microrganismos patogênicos em alimentos têm sido reportados cada vez com maior frequência, o que acaba sendo uma preocupação tanto para consumidores quanto para a indústria. Estima-se que ocorram em torno de 80 mil casos de vibriose por ano nos Estados Unidos e cerca de 52 mil desses casos seja pela ingestão de alimentos contaminados. A espécie mais comumente relatada é o *Vibrio parahaemolyticus*, sendo responsável por 45 mil doenças por ano nos Estados Unidos (CDC, 2016). De forma alarmante, esta tendência não é restrita aos EUA, fenômeno muito provavelmente provocado pelo

aquecimento da temperatura dos oceanos (BAKER-AUSTIN et al 2012; MARTÍNEZ-URTAZA et al 2010; LEVY, 2015).

O primeiro caso confirmado de infecção por *V. parahaemolyticus* na América do Sul ocorreu em 1975, no Ceará, Brasil, e foi relatado como caso isolado de diarreia aquosa em uma criança de 6 anos de idade (HOFER, 1983). A cepa foi sorotipada como O5:K17, Kanagawa-positivo. Não há dados epidemiológicos disponíveis, exceto que a população local era conhecida por comer peixes marinhos e de água doce curados com sal (DOS SANTOS e VIEIRA, 2013; HOFER, 1983). A legislação brasileira estabeleceu o limite máximo para *V. parahaemolyticus* de 10^3 UFC/g de pescado pronto para o consumo (BRASIL, 2001). Em 2002, foram relatados 26 casos entre os hóspedes de dois hotéis no Ceará e *V. parahaemolyticus* O3:K6 foi encontrado em 45% deles, porém a bactéria não foi isolada a partir de amostras de alimento (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002).

Outra espécie envolvida em DTA através do consumo pescados é *V. vulnificus*. As infecções por consumo geralmente se dão pela ingestão de moluscos crus, principalmente ostras, onde a bactéria pode ocorrer em grande número (10^5 UFC/g ou mais). O CDC (2017a) estima que *V. vulnificus* seja responsável por cerca de 205 infecções por ano nos Estados Unidos. Infelizmente, poucos países, com exceção dos Estados Unidos (NEWTON et al., 2012), mantêm sistemas de vigilância efetivos, dedicados e legalmente aplicados para esse agente patogênico, o que dificulta grandemente nossa compreensão e visão global das doenças causadas pelo *V. vulnificus*.

No Brasil, Araújo et. al (2007) descreveram um caso de vibriose causada pelo *V. vulnificus* no estado de São Paulo. O paciente era um idoso, com sintomas de gastroenterite, lesões nos membros e em choque séptico. Ele havia ingerido pescados três dias antes da internação. Foi diagnosticado e tratado, porém foi à óbito.

Outro caso no Brasil ocorreu no Paraná, um homem de 39 anos, em uso de medicação imunossupressora, admitido no hospital para transplante hepático. Doze horas após a internação, o paciente evoluiu com febre, mialgias, anúria e placas eritematosas em membros inferiores, com rápido crescimento e evolução proximal. O paciente foi tratado sem melhora e foi à óbito em 30 horas. Na hemocultura, foi identificado *Vibrio vulnificus* (FRANÇA et al., 2013).

Uma revisão de 459 casos nos EUA notificados à Food and Drug Administration entre 1992 e 2007 revelou que 51,6% dos pacientes infectados com *V. vulnificus* morreram (JONES E OLIVER, 2009). Mais recentemente, dados do Cholera And Other Vibrio Information Service (2017), que mantém informações epidemiológicas sobre *Vibrio* nos Estados Unidos, mostram que durante o período de 1988 a 2010 ocorreram 1874 casos de infecções por *V. vulnificus* e quase 600 óbitos foram relatados. Atualmente, cerca de 30% das infecções são fatais (CDC, 2017b).

A literatura científica na área da ciência e tecnologia de alimentos tem mostrado, nos últimos anos, enfoque no estudo do potencial antimicrobiano das especiarias, considerando a sua inclusão nos sistemas de bioconservação de alimentos. Os óleos essenciais de condimentos, através da combinação de sabor e aroma, são geralmente aceitos (AYALA-ZAVALA et al., 2009), sendo referidos como uma alternativa natural capaz de prover a extensão da vida útil e satisfatória segurança microbiológica de alimentos (FIORENTINI et al., 2001).

Os óleos essenciais são constituídos por metabólitos secundários de plantas aromáticas, são voláteis e possuem forte odor. São normalmente obtidos por meio de vapor ou hidrodestilação (BAKKALI et al., 2008). Por possuírem ação antisséptica (bactericida, fungicida e virucida), as propriedades dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais têm sido exploradas há muitos anos e atualmente o uso destes óleos tem se intensificado com o propósito de serem aplicados na conservação de alimentos por se tratar de substitutos mais seguros para a sua conservação em relação aos aditivos químicos sintéticos (DORMAN e DEANS, 2000).

Os óleos essenciais são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana frente a sua ação. Esta característica deve-se ao fato dos óleos essenciais serem constituídos por misturas de componentes, que, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana e, desta forma, tornam mais difícil a adaptação dos microrganismos (DAFERERA et al., 2000).

A composição química dos óleos essenciais é bastante complexa e o teor variável, sendo formados por mais de 100 componentes (NASCIMENTO et al., 2007). Esta variação ocorre devido a fatores genéticos e ambientais, como

climáticos, ação de predadores, idade da planta, etc. (GOBBO NETO e LOPES, 2007).

Considerando o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antibacteriana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que seja direcionada a vários alvos na célula, provocando alterações da membrana citoplasmática, perturbações sobre a força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e na coagulação do conteúdo da célula. Nem todos esses mecanismos atingem alvos separados, podendo alguns ocorrer em consequência de outro mecanismo (BURT, 2004).

A maioria dos óleos essenciais exerce efeito antimicrobiano na estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Por meio de íons de hidrogênio e potássio, alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática, causando a interrupção dos processos vitais da célula, como translocação de proteínas, transporte de elétrons, fosforilação, entre outras reações que dependem de enzimas, resultando na perda do controle quimiosmótico da célula afetada, ocorrendo assim a morte bacteriana (DORMAN e DEANS, 2000).

Snoussi et al. (2008) observaram que o óleo essencial de algumas plantas, especialmente o *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Eugenia caryophyllata* (cravo) podem ser usadas na preparação de pescados para proteger contra a contaminação por *Vibrio* spp., uma vez que o diâmetro das zonas de inibição do crescimento no teste de difusão em disco para espécies de *V. parahaemolyticus* foi bastante alto e as concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas foram baixas, principalmente quando utilizado o óleo essencial de *T. vulgaris*. Snoussi et al. (2015), também testaram 16 cepas de diferentes espécies de *Vibrio* frente ao óleo essencial de *Mentha spicata* (hortelã verde) em ensaios de difusão em disco e microdiluição. Todos os microrganismos foram fortemente afetados, indicando potencial antimicrobiano do óleo frente ao gênero *Vibrio*.

O. basilicum é uma planta medicinal pertencente à família Lamiaceae e tornou-se importante por apresentar utilização na cosmética, na alimentação e, devido às suas propriedades terapêuticas, na indústria farmacêutica (COSTA et al., 2009). *O. basilicum* é uma erva culinária importante e contém alta proporção de derivados fenólicos, incluindo eugenol e linalool. É amplamente cultivada devido à sua adaptabilidade a uma variedade de condições ambientais distintas. Alves (2010), Pozzo et al. (2011), Silveira (2012) e Al abbasy et al. (2015), citam Linalol, 1,8-cineol

e eugenol como os constituintes mais abundantes e responsáveis pela atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. basilicum*.

Koga (1999) demonstrou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. basilicum*, que promoveu inibição total de *V. parahaemolyticus* em concentração de 0,05 %. Além disso, foi observada maior sensibilidade das bactérias aos óleos quando em fase de crescimento exponencial. Hossain et al. (2010) também evidenciaram efeito inibidor do óleo essencial de *O. basilicum*, estudando a ação antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *V. parahaemolyticus*. Já Trajano et al. (2009) verificaram que o *O. basilicum* inibiu *E. coli* e *P. aeruginosa*.

O. vulgare é usado como aromatizante para produtos alimentares e bebidas alcoólicas (ALIGIANNIS et al., 2001), além também de possuir propriedades antimicrobianas (JEAUROUND et al., 2002). Os principais compostos químicos ativos são carvacrol, timol, eugenol, cimeno, pineno e linalol (VERNIN et al., 2001).

Prudent et al. (1995) verificaram atividade do óleo essencial de *O. vulgare* contra *Vibrio cholera* na concentração de 0,125 mg/mL. Albado et al. (2001) testaram a atividade antibacteriana pelo método de difusão em ágar e obtiveram resultados positivos contra o microrganismo anteriormente citado. Yano (2006) testou ação do óleo de *O. vulgare* sobre cepas de *V. parahaemolyticus* e verificou efeito deste na concentração de 0,5 %.

Goulas e Kontominas (2007) verificaram que a adição de óleo essencial de *O. basilicum* na concentração 0,8% atrasou a deterioração de filés salgados de *Sparus aurata* e, através da análise sensorial, confirmaram que o óleo conferiu sabor agradável ao produto.

3. Material e métodos

3.1 Obtenção dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. basilicum*

Foram adquiridas folhas secas de *O. vulgare* e *O. basilicum* da indústria Luar Sul Indústria e Comércio, localizada em Santa Cruz do Sul, Brasil. A partir dessas folhas, foram extraídos os óleos através da metodologia estabelecida pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), por meio do processo de hidrodestilação por arraste a vapor por 3 horas, com auxílio do equipamento Clevenger. Após a extração, os óleos essenciais foram armazenados em frascos âmbar e mantidos a temperatura de -18 °C.

3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi testada frente aos microrganismos *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus*, compreendendo uma cepa de referência de cada microrganismo (ATCC 8001 e ATCC 27562) e dois isolados selvagens de cada um dos microrganismos. Os isolados selvagens de *V. parahaemolyticus* (V3 e V6) foram previamente identificados de *M. platanus* capturados no estuário da Lagoa dos Patos em trabalho realizado por Rosa et al. (2016). Os isolados de *Vibrio vulnificus* (37 e 38) foram isoladas de *Paralichthys orbignyanus* (linguado) também capturados no estuário da Lagoa dos Patos em trabalho ainda não publicado realizado por Silveira et al. O efeito antimicrobiano foi verificado através da técnica de disco-difusão e da concentração bactericida mínima (CBM).

A análise de disco-difusão foi executada de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (2015), com algumas modificações, na qual 0,1 mL da cultura com aproximadamente 10^7 UFC/mL, sendo essa concentração medida através da densidade óptica e contagem em placas, foram distribuídos uniformemente, com auxílio de alça de Drigalsky, na superfície de ágar Mueller-Hinton (Kasvi, Roseto Degli Abruzzi, Italia) acrescido de 1 % de cloreto de sódio.

Discos de papel filtro estéreis com 6mm de diâmetro foram depositados sobre o meio inoculado, e então foram impregnados com 5 µL do óleo a ser testado,

sendo óleo de *O. vulgare*, óleo de *O. basilicum* e da mistura dos dois óleos em partes iguais. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Discos sem adição de óleo foram analisados como controle de multiplicação.

Após a incubação foi medido o diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano, incluindo o diâmetro do disco. As médias das medidas dos halos foram classificadas de acordo com escala estipulada por Carovic'-Stanko et al. (2010), sendo considerada forte ação inibitória quando os halos de inibição foram maiores que 15 mm; moderada ação inibitória com halos entre 10 e 15 mm e efeito não inibitório quando os halos foram menores que 10 mm. As médias das medidas dos halos foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o programa Statistix®.

A CBM foi executada conforme preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), com pequenas modificações. Foram utilizadas microplacas com 96 poços. Em cada poço, foram dispensados 50 µL de água peptonada alcalina (APA, Himedia, Mumbai, Índia) com 1 % de Tween 80, utilizado para diminuir a tensão superficial no contato do óleo (apolar) com o meio de cultura (polar). No primeiro poço, foram dispensados 50 µL do óleo essencial em teste (óleo essencial de *O. vulgare*, de *O. basilicum* ou mistura dos dois óleos em partes iguais) e a partir deste, foram feitas diluições seriadas consecutivas, retirando 50 µL do poço de maior concentração para o de menor concentração, totalizando oito diluições e atingindo a mínima concentração de 1,95 µL/mL. No final, os últimos 50 µL foram descartados. Após, foram adicionados 50 µL da cultura bacteriana com aproximadamente $5,0 \times 10^3$ células bacterianas em cada um dos poços.

Poços sem adição do óleo e sem adição do inóculo foram utilizados para controles de multiplicação e de esterilidade, respectivamente. As placas foram incubadas a 36°C durante 48 horas. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 5 µL de cada uma das cavidades e repicadas em placas de ágar padrão para contagem (PCA, Acumedia, Baltimore, Maryland).

A ausência de crescimento bacteriano no meio de cultura foi indício de que o óleo essencial testado apresentou atividade bactericida. A CBM foi considerada como a menor concentração de óleo na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

Essas análises foram realizadas em hexaplicata.

3.3 Aplicação em filés de *M. platanus* experimentalmente contaminados

Foram adquiridas unidades inteiras de pescado fresco da espécie *M. platanus* no Mercado Público de Pelotas, que foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e imediatamente levadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas, onde, de forma asséptica, foram filetadas para posterior elaboração das amostras.

Conforme metodologia utilizada por Van Haute et al. (2016), com pequenas modificações, as amostras constituíram-se de 10 g de filé de *M. platanus*, que foram experimentalmente contaminadas com 0,1 mL de inóculo bacteriano na concentração 10^3 UFC/mL, de forma obter a concentração final de 10^1 células bacterianas por grama de pescado. Em seguida, as amostras foram marinadas (imersas) em solução aquosa de óleo essencial de *O. vulgare* nas concentrações 1 % e 1,5 %, e foram armazenadas a 4 °C por 24 horas.

Concomitantemente, foram analisadas amostras contaminadas experimentalmente sem a utilização do óleo, para controle positivo, e também amostras não contaminadas, para garantia de que não havia prévia contaminação do filé por *Vibrio*.

Após as 24 horas, as amostras foram retiradas do contato com a solução, deixando escorrer o excesso. Para verificar se o óleo inativou o *Vibrio* que foi inoculado nas amostras, foi realizada a pesquisa, conforme recomendado por U. S. Food and Drug Administration (KAYSNER e DEPAOLA, 2004). Os filés foram colocados em sacos plásticos estéreis, acrescidos de água APA e homogeneizados. Ficando incubados a 37 °C por 24 horas.

Quando atingido o período de incubação, alíquotas de cada amostra foram semeadas por esgotamento em placas de ágar Tiosulfato, Citrato, Bile e Sacarose (TCBS, Himedia, Mumbai, India), de forma a obter colônias isoladas. O não crescimento de colônias típicas foi considerado como ação bactericida do óleo frente ao microrganismo.

As análises foram realizadas em triplicata.

3.4 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada de acordo com Silveira (2012), com algumas modificações. Os filés de *M. platanus* foram marinados em solução com 1,5 % de óleo essencial de *O. vulgare* e assim permaneceram por 24 horas, sob refrigeração.

Em seguida os filés foram empanados de acordo com Gonçalves e Gomes (2008), fritos e oferecidos a 100 avaliadores não treinados com faixa etária acima de dez anos de idade. Após assinatura do termo de consentimento (Anexo A), foram aplicadas as fichas de intenção de compra (Anexo B), ficha hedônica (Anexo C) e a ficha de pesquisa de mercado (Anexo D).

Para interpretação, seguindo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (1998), a média e o desvio padrão foram calculados utilizando a escala hedônica estruturada de nove pontos, onde 9 representa a nota máxima “gostei extremamente” e 1 a nota mínima “desgostei extremamente”.

3.5 Comitê de ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas, conforme parecer nº 1.718.391.

4. Resultados e discussão

4.1 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Na análise de disco-difusão, os óleos essenciais de *O. vulgare* e de *O. basilicum* demonstraram efeitos distintos (Tabela 1). O óleo de *O. vulgare* apresentou halos de inibição que, de acordo com Carovic´-Stanko et al. (2010), são considerados como forte atividade antimicrobiana. Já os halos de inibição do óleo essencial de *O. basilicum* foram nulos, indicando ausência de ação antimicrobiana.

Tabela 1 - Tamanho dos halos (mm) de inibição do crescimento bacteriano frente aos óleos essenciais no teste de disco-difusão.

Microrganismo	<i>O.vulgare</i> *	<i>O.basilicum</i>	<i>O.vulgare</i> + <i>O.basilicum</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>			
ATCC 8001	34,2a (1,7)	0,0c	9,3b (0,8)
V3 (Isolado selvagem)	25,0a (1,4)	0,0c	13,3b (1,0)
V6 (Isolado selvagem)	24,6a (1,2)	0,0c	15,0b (1,5)
<i>V. vulnificus</i>			
ATCC 27562	26,6a (0,8)	0,0c	15,3b (1,5)
37 (Isolado selvagem)	29,6a (1,5)	0,0c	14,0b (1,4)
38 (Isolado selvagem)	32,0a (1,2)	0,0c	13,6b (1,0)

*Os dados referem-se à média de seis repetições com o desvio padrão entre parênteses. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) pelo método de Tukey.

Também na CBM (Tabela 2), o óleo essencial de *O. basilicum* não apresentou efeito antibacteriano, frente a todos microrganismos testados. Não apresentando inibição nem mesmo na maior concentração testada, que foi 250 $\mu\text{L/mL}$.

Tabela 2 - Concentração bactericida mínima ($\mu\text{L}/\text{mL}$) dos óleos essenciais de *O. vulgare*, de *O. basilicum* e da mistura, em partes iguais, dos dois óleos.

Microrganismo	<i>O.vulgare</i> *	<i>O.basilicum</i>	<i>O.vulgare</i> + <i>O.basilicum</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>			
ATCC 8001	7,8	SE*	31,2
V3 (Isolado selvagem)	15,6	SE*	62,4
V6 (Isolado selvagem)	15,6	SE*	62,4
<i>V. vulnificus</i>			
ATCC 27562	15,6	SE*	62,4
37 (Isolado selvagem)	3,9	SE*	7,8
38 (Isolado selvagem)	3,9	SE*	7,8

Os testes foram realizados em hexaplicata e os valores foram os mesmos nas seis repetições. * SE = sem efeito antimicrobiano.

Koga et al. (1999) testaram o efeito do óleo essencial de *O. basilicum* frente a *V. parahaemolyticus* e também frente à mesma cepa de *V. vulnificus* (ATCC 27562) testada no presente estudo e verificaram que ambas foram completamente eliminadas quando utilizado óleo essencial na concentração 0,05%. Hossain et al. (2010) observaram que o óleo de *O. basilicum* propiciou a formação de halos de inibição do crescimento de *V. parahaemolyticus* de 14,3 mm no teste de disco-difusão e concentração inibitória mínima (CIM) de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A diferença entre esses dados e nosso trabalho pode ser explicada pelas alterações na metodologia, sendo que Koga (1999) utilizaram óleo adquirido de uma empresa, podendo o método de extração ser diferenciado. E Hossain et al. (2010) utilizaram o óleo essencial diluído em metanol no teste de disco-difusão e a cepa de *V. parahaemolyticus* utilizada era de isolado local, podendo ter variações na sensibilidade.

Variações na composição química dos óleos essenciais podem também ser responsáveis por essa diferença nos resultados, uma vez que a composição pode ser alterada conforme a parte da planta, o horário do dia, o ambiente, grau de desenvolvimento, podendo também ser determinada geneticamente, variando de acordo com a origem botânica, fatores ambientais e procedimentos de cultivo (MAIA, 2008).

Os compostos majoritários do óleo essencial de *O. basilicum* podem ser biossintetizados por diferentes rotas biossintéticas: a rota do chiquimato e do mevalonato, gerando eugenol e linalol, respectivamente (SIMÕES & SPITZER, 1999). Segundo Devi et al. (2010), a ação bactericida do eugenol (componente majoritário sintetizado pela rota do chiquimato) é devido a sua penetrabilidade na

membrana citoplasmática, promovendo seu rompimento e aumentando sua permeabilidade não específica, desta forma gerando um extravasamento do conteúdo celular e posterior morte da bactéria. Logo, o fato de serem microrganismos Gram negativos pode ter afetado a ação do óleo, pois restringe a difusão de compostos através da parede externa.

Snoussi et al. (2016) analisaram a composição do óleo de *O. basilicum* que foi submetido aos testes antimicrobianos e verificaram que o componente majoritário era o linalol (componente majoritário da rota mevalonato). Esse óleo, quando testado, inibiu todas as cepas de *Vibrio* spp, indicando potencial antimicrobiano, demonstrado por diâmetro de inibição de crescimento variando de 8,67 a 23,33 mm e valores de CBM variando entre menor que 3 e 24 mg / mL.

O óleo de *O. vulgare* apresentou a formação de consideráveis halos de inibição. Estes resultados estão conforme estudo em que a atividade antimicrobiana de *O. vulgare* também foi observada contra *V. parahaemolyticus* (YANO, 2006).

Quando analisado o efeito antimicrobiano da mistura, em partes iguais, dos óleos essenciais, observa-se que não há indício de sinergismo entre os óleos, uma vez que a formação dos halos foi compatível com a concentração do óleo utilizada, ou seja, os halos formados pela mistura dos óleos em geral tiveram aproximadamente metade do tamanho dos halos formados pela ação unicamente do *O. vulgare*.

Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, Barbosa et al. (2016), em um estudo utilizando mistura de óleos, verificaram atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* misturado com óleo de *R. officinalis* (alecrim) no teste de disco-difusão. Os óleos demonstraram interação sinérgica e foram efetivos frente a agentes patogênicos como *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Enteritidis*. Entretanto, o óleo essencial de *O. vulgare* não demonstrou ser capaz de agir sinergicamente com o óleo essencial de *O. basilicum*, pelo menos contra *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

As diferenças observadas nos valores da CBM entre as cepas de referência e as cepas selvagens, possivelmente ocorreram devido à cepa de referência já ser trabalhada laboratorialmente há muitas gerações, o que pode afetar as características do microrganismo.

4.3 Aplicação do óleo essencial de *O. vulgare* em filés de *M. platanus* experimentalmente contaminados

Quando os filés foram marinados em solução com concentração de 1 % de óleo essencial de *O. vulgare* não houve efeito bactericida. Apenas quando os filés foram marinados em solução de 1,5 % foi observado efeito bactericida sobre as cepas de *Vibrio* que haviam sido experimentalmente inoculadas. O controle positivo apresentou crescimento de todas as cepas testadas e o controle negativo não apresentou crescimento dessas bactérias.

As informações publicadas sobre controle microbiológico em pescados utilizando óleos essenciais é limitada, principalmente utilizando metodologia compatível com o presente trabalho. Mexis et al. (2009) adicionaram óleo essencial de *O. vulgare* sobre a superfície de filés de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) e verificaram aumento da vida útil dos filés em 7-8 dias, através das avaliações físico-químicas e microbiológicas (contagem de mesófilos aeróbios, *Pseudomonas* spp., bactérias ácido lácticas, bactérias produtoras de H₂S, Enterobactérias e *Clostridium* spp.). Van Haute et al. (2016) marinaram produtos à base de peixe em óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, *O. vulgare* e *Thymus vulgaris* e mesmo em baixa concentração (1 %) os óleos mostraram potencial para retardar o crescimento bacteriano (coliformes totais, leveduras, bactérias ácido lácticas e bactérias psicrófilas aeróbicas).

Componentes dos alimentos como proteínas, gorduras, são conhecidos por se ligar e/ou solubilizar compostos fenólicos, reduzindo sua atividade antimicrobiana. Este fato mostra que a atividade antimicrobiana de plantas condimentares pode ser menor em sistemas alimentares do que em meios de cultura (SHELEF et al., 1983). No presente trabalho, a concentração mais elevada da CBM foi 1,5 % e quando essa concentração foi testada com aplicação no alimento seguiu tendo resultados satisfatórios, ou seja, eliminando os microrganismos.

4.4 Análise sensorial

Os filés de *M. platanus* preparados para a análise sensorial foram marinados em solução com concentração 1,5 % do óleo essencial de *O. vulgare*, visto que essa concentração apresentou efeito antimicrobiano frente às cepas de *Vibrio* testadas nas análises anteriores.

Na análise sensorial foi aplicada aos participantes uma ficha de pesquisa de mercado em que 62 % dos avaliadores relataram ter costume de consumir pescados, principalmente por questões culturais e por ser um alimento saudável. Aqueles que disseram não ter costume alegaram ser devido à dificuldade de compra, preço elevado ou falta de hábitos culturais. Dos avaliadores, 6% disseram ter problemas em consumir alimentos acrescidos com condimentos, principalmente por não gostar das apresentações dos produtos pré-prontos disponíveis no mercado.

No preenchimento da ficha hedônica, 70 % dos julgadores apresentaram algum grau de aceitabilidade ao sabor do produto (Figura 1), sendo que a maioria assinalou “gostei muito” ou “gostei moderadamente”. Tanto as pessoas que gostaram, como as que desgostaram do produto, descreveram que a adição do óleo do *O. vulgare* acabou atenuando o sabor do pescado, fato este que acabou agradando quem não tem hábito de consumir filé de *M. platanus*, que é um peixe de sabor marcante, e gerando menor aceitação naqueles avaliadores que gostam do sabor característico desse pescado.

Quando foram atribuídos valores às alternativas da escala hedônica, sendo 9 representando a nota máxima “gostei extremamente” e 1 a nota mínima “desgostei extremamente”, a nota média de aceitação foi de 68,22, valor que proximamente corresponde a 7, ou seja, “gostei moderadamente”.

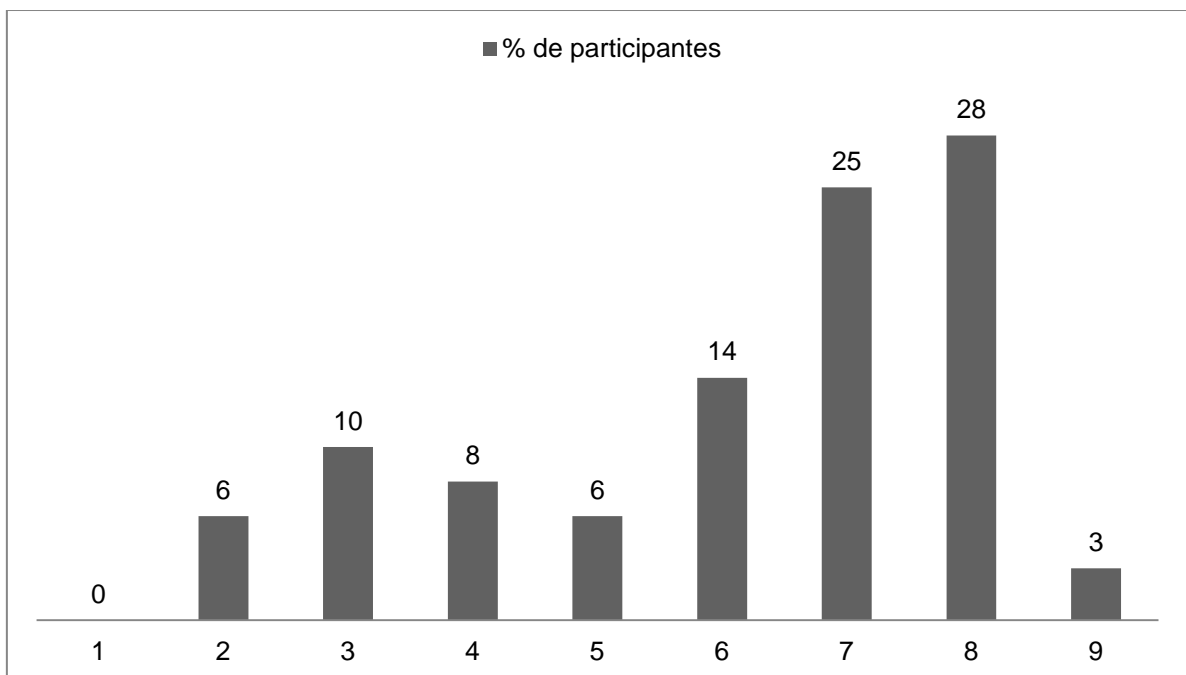


Figura 1 - Teste da aceitação de filé de *M. platanus* marinado em óleo essencial de *O. vulgare*; 1= Desgostei extremamente, 2= Desgostei muito, 3= Desgostei moderadamente, 4= Desgostei ligeiramente, 5= Indiferente, 6= Gostei ligeiramente, 7= Gostei moderadamente, 8= Gostei muito, 9= Gostei extremamente.

Na ficha de intenção de compra (Figura 2), mais da metade dos avaliadores alegaram positividade na intenção de compra, sendo que 45 % marcaram “provavelmente compraria”. Nos comentários, aqueles que “provavelmente comprariam” registraram que a adição do óleo de orégano gerou uma boa combinação de sabor, que provavelmente comprariam devido ao fato de atenuar o sabor de *M. platanus* e também pelo fato de ser um produto com proposta mais saudável.

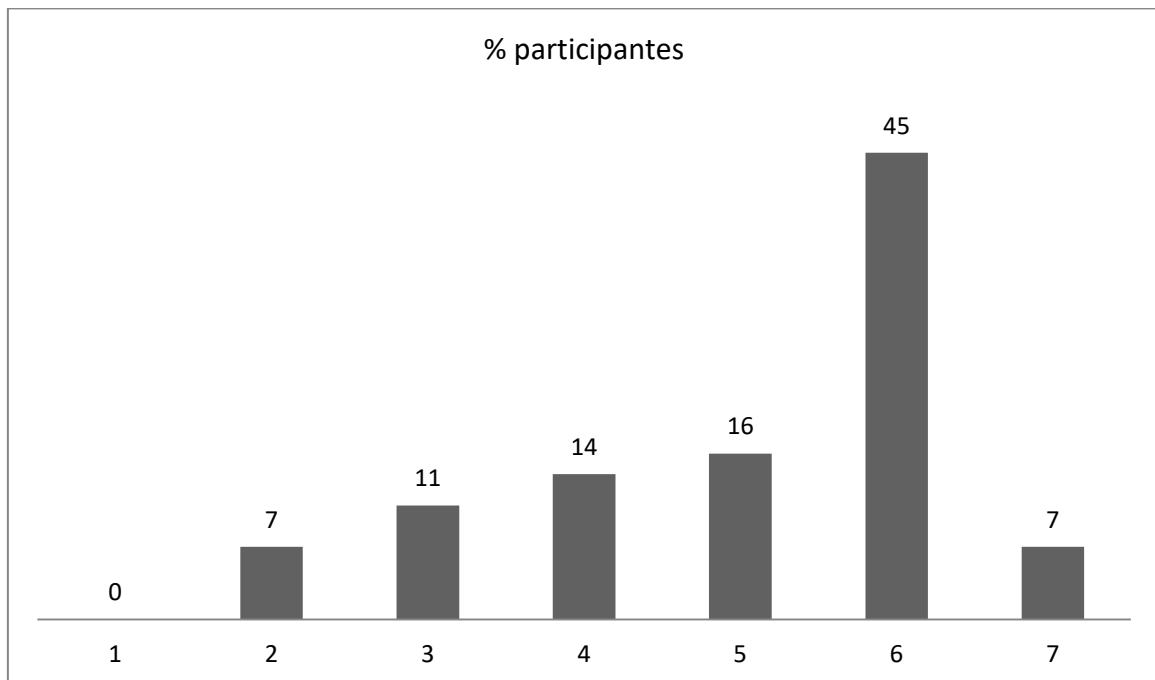


Figura 2 - Teste de intenção de compra para embutido filé de *M. platanus* marinado em óleo essencial de *O. vulgare*; 1= Compraria somente se fosse forçado, 2= Compraria ocasionalmente, 3= Decididamente eu não compraria, 4= Provavelmente eu não compraria, 5= Talvez sim/talvez não, 6= Provavelmente eu compraria, 7= Decididamente eu compraria.

Os participantes que tiveram indiferença ao produto, “talvez sim/talvez não”, registraram que o preço do produto seria um ponto crucial para escolha da compra. Minozzo et al. (2008) afirmaram que as características gerais do consumo de carne pela população brasileira são focadas em preço, aspecto este também verificado para o pescado. Em estudo realizado na cidade de Pelotas por Porto (2011), foi demonstrado que 60 % dos entrevistados consideram o pescado caro ou muito caro. O mesmo foi percebido em estudo realizado por Jesus et al. (2014) em uma cidade do Amazonas, no qual os entrevistados afirmaram que aumentariam a frequência de consumo de pescado se o preço fosse mais acessível.

Aqueles que marcaram “provavelmente não compraria” (14 %) e “decididamente eu não compraria” (11 %) descreveram que assim o fariam devido ao forte sabor do óleo essencial e alguns por já não ter costume de consumir pescados. Os que “ocasionalmente comprariam” alegaram ser devido a já consumir pescados ocasionalmente e não devido à adição do óleo. Dados de Porto (2006) indicaram que 64 % da população de Pelotas consome pescados eventualmente. Segundo Solomon (2011), datas religiosas, como a quaresma e semana santa levam o consumidor a aumentar o consumo de pescados, sendo a orientação religiosa considerada uma forma de influência de consumo.

Van Haute et al. (2016) afirmam que as propriedades sensoriais do pescado são inevitavelmente afetadas (positivamente, de forma neutra ou negativamente) quando as concentrações de óleos essenciais necessárias para estender a vida útil do produto são aplicadas. O efeito sensorial resultante da combinação de um determinado óleo essencial no alimento é um fator significativo, uma vez que nem todas as combinações e concentrações serão aceitáveis ao consumo e uso comercial. No presente trabalho, quando adicionada a concentração em que foi efetiva a ação bactericida, houve aceitação do produto, indicando então, que as características sensoriais foram favoráveis.

5 Considerações finais

O óleo essencial de *O. vulgare* possui atividade antibacteriana, sendo formador de halos de inibição no teste de disco-difusão e apresentando CBM relativamente baixa frente a todas as cepas de *Vibrio* utilizadas. Já o óleo essencial de *O. basilicum* não apresentou ação antimicrobiana em nenhum dos testes executados no estudo.

O óleo essencial de *O. vulgare*, quando aplicado na concentração de 1,5 % em filés de *M. platanus* experimentalmente contaminados, é efetivo para eliminar a contaminação por *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Sua utilização, nessa concentração, não prejudica a palatabilidade do pescado, pois quando submetido aos testes sensoriais, houve aceitação pelo consumidor.

A utilização de óleos essenciais de *O. vulgare* no controle da contaminação por *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* em pescados destinados ao consumo humano é uma alternativa promissora para a segurança do alimento em substituição aos de conservantes químicos sintéticos.

Referências

AL ABBASY, D. W.; PATHARE, N.; AL-SABAHI, J. N.; KHAN, S. A. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum*) **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 8, p. 645-649, 2015.

ALBADO, P.E.; SAEZ, F.G.; GABRIEL, A.S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). **Revista Médica**, v. 12, n. 1, p. 16-19, 2001.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, R. **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de folhas de manjeriço, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos em alimentos**. 2010, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ANSESIO, C. M.; GROSSO, N. R.; JULIANI, H. R. Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum* spp.). Essential oils from Central and Southern Argentina. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 203-213, 2015.

ARAÚJO, M. R. E.; AQUINO, C.; SCARAMAL, E.; CIOLA, C. S.; SCHETTINO, G.; MACHADO, M. C. C. *Vibrio vulnificus* Infection in São Paulo, Brazil: Case Report and Literature Review. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 302-305, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR 14141: **Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro, 1998.

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.

BAFFONE, W.; PIANETTI, A.; BRUSCOLINI, F.; BARBIERI, E.; CITTERIO, B. Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 9-18, 2000.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.

BAKER-AUSTIN, C.; TRINANES, J.A.; TAYLOR, N.G.H.; HARTNELL, R., SIITONEN, A.; MARTÍNEZ-URTAZA, J. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. **Nature Climate Change journal**, v. 3, p. 73-77, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.

BARBOSA, Lidiane Nunes. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 107 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/87782>. Acesso em 28 nov. 16.

BARBOSA, M. I.; MEDEIROS, C. A. J.; OLIVEIRA, R. A. K.; NETO, G. J. N.; TAVARES, F. J.; MAGNANI, M.; SOUZA, L. E. Efficacy of the combined application of Orégano and Rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. **Food Control**, v. 59, p. 468-477, 2016.

BERNBOM, N.; NG, Y.Y.; PALUDAN-MÜLLER, C.; GRAM, L. Survival and growth of *Salmonella* and *Vibrio* in som-fak, a Thai low-salt garlic containing fermented fish product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 3, p. 223-229, 2009.

BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Resolução - RDC Nº 12**, de 2 de Janeiro de 2001.

BRASIL, Agência Nacional De Vigilância Sanitária, **Farmacopeia Brasileira**, v. 2, 2010, 904p.

BRASIL, Ministério Da Pesca E Aquicultura e Ministério do Meio Ambiente (MPA/MMA). **Plano de gestão para o uso sustentável da tainha, Mugil liza Valenciennes**, 1836, no Sudeste e Sul do Brasil. Brasília, 2015. 137 p

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 233-253, 2004.

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.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Vibrio parahaemolyticus***. 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/vibriop/learn>. Acesso em: 19 jul. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Vibrio vulnificus* Infections and Disasters**. 2017a. Disponível em <https://www.cdc.gov/disasters/vibriovulnificus.html>. Acesso em 04 jan. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Cholera and Other *Vibrio* Illness Surveillance (COVIS)**, 2017b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vibrio/surveillance.html>. Acesso em 04 jan. 2018

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Manual Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; v. 9. CLSI document M07-A9, Pennsylvania USA, 2012.

COLAKOGLU, F. A.; SARMASIK, A.; KOSEOGLU, B. Occurrence of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. **Food Control**, v. 17, n. 8, p. 648-652, 2006.

COSTA, C.M.G.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; AGRA, P.F.M.; FARIAS, M.A.A. Efeito inibitório do óleo essencial de manjeriço sobre o crescimento *in vitro* de *Erwinia carotovora*. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 3, p. 35-38, 2009.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N; POLISSIOU, M.G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2576-81, 2000.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. J. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107-115. 2010.

DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 88, n. 2, p. 308- 16, 2000.

DOS SANTOS, C.A.L.; VIEIRA, R.H.S.F. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 1-10, 2013.

FIORENTINI, A.M.; SANT'ANNA, E.S.; PORTO, A.C.S.; MAZO, J.Z.; FRANCO, B.D.G.M. Influence of bacteriocins produced by *Lactococcus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 42-46, 2001.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002. 424 p.

FRANÇA, J. C. B.; SANFELICE, E.; GENTILI, A.; RABONI, S. M.; MARA, S.; POLIDO, D.; MARQUES, F.; *Vibrio vulnificus* infection in Southern Brazil - Case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 424-426, 2013.

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

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

GOBBO NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.

GONÇALVES, A. A.; GOMES, P. A. Desenvolvimento de um produto de valor agregado: camarão empanado corte butterfly. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 3, n.1, 2008.

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.

HEITMANN, I.G.; JOFRE, L.M.; HORMAZABAL, O.J.C.; OLEA, A.; VALLEBUONA, C.; VALDES, C. Review and guidelines for treatment of diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 22, n. 2, p.131-140, 2005.

HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. **Revista de Microbiologia**, v.14, p.174-75, 1983.

HOSSAIN, M. AMZAD; KABIR, M. J.; SALEHUDDIN, S. M.; MIZANUR RAHMAN S. M.; DAS A. K.; SINGHA, S. K.; ALAM K.; RAHMAN, A. Antibacterial properties of essential oils and methanol extracts of sweet basil *Ocimum basilicum* occurring in Bangladesh. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 5, p. 504-11, 2010.

HUSS, H.H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v.8, p.91-98, 1997.

JEAUROUND, E.; SCHUMANN, B.; CLUNIES, M. Supplementation of diets with herbal extracts enhances growth performance in newly-weaned piglets. **Journal of Animal Science**, v. 20, n. 1, p. 394, 2002.

JONES, M. K ; OLIVER, J.D. *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. **Infection And Immunity**, v. 77, n. 5, p. 1723-1733, 2009.

JESUS D.V.; SOUZA R.T.Y.B.; OLIVEIRA S.R. Consumo de pescado pela população de São Gabriel da Cachoeira-AM. **Revista Educação, Ciência e Tecnologia do IFAM**. v. 8, p. 15-27. 2014.

KALIKOSKI, D. C.; VASCONCELLOS, M. Estudo das condições técnicas, econômicas e ambientais da pesca de pequena escala no estuário da Lagoa dos Patos, Brasil: uma metodologia de avaliação. **FAO Fisheries and Aquaculture, Circular**, n. 1075, p. 227, 2013.

KAYSNER, C.A.; DEPAOLA Jr. *Vibrio*. U.S. Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual (BAM)**, 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>. Acesso em: 18 de março 2017.

KOGA, T.; HIROTA N.; TAKUMI, K. Bactericidal activities of essential oils of basil and sage against a range of bacteria and the effect of these essential oils on *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiological Research**, v. 154, p. 267-273, 1999.

KOKKINI, S.; VOKOU, D. Carvacrol-rich plants in Greece. **Flavour and fragrance journal**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 1989.

LEMAY, W.J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P.; GARIÉPY, C.; RODRIQUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooled and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 3, p. 217-226, 2002.

LEVY, S. Warming trend: how climate shapes *Vibrio* ecology. **Environ Health Perspect**, v. 123, p. 82-89, 2015.

LIMA, F.C. Vibrios marinhos II. Vibrios não coléricos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 49, p. 8-13, 1997.

LHAFI, SK.; KUHNÉ, M. Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 297-300, 2007.

MAIA, J. G. S. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: Seu aproveitamento industrial para produção de aromas e sabores. **Edufes**, Vitoria, ES, 2008

MARTINEZ-URTAZA, J.; LOZANO-LEON, A.; DEPAOLA, A.; ISHIBASHI, M.; SHIMADA, K.; NISHIBUCHI, M.; LIEBANA, E. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Santiago de Compostela, v. 42, p. 4672-4678, 2004.

MARTINEZ-URTAZA, J.; BOWERS, J.C.; TRINANES, J.; DEPAOLA, A. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. **Food Research International**, v. 43, p. 1780-1790, 2010.

MENEZES, N.A.; FIGUEIREDO, J.L., 1985. **Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil** V. Teleostei (4). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 105p.

MEXIS, S.F.; CHOULIARA, E.; KONTOMINAS, M.G. Combined effect of an oxygen 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.

MINOZZO, M.G.; HARACEMIV, S.M.C.; WASZCZYNSKYJ, N. Perfil dos consumidores de pescado nas cidades de São Paulo (SP), Toledo (PR) e Curitiba (PR) no Brasil. **Alimentação humana**, v. 14, n. 3, p. 133-140, 2008.

MUKUNDAN, M. K.; ANTONY, P. D.; NAIR, N. R. A review on autolysis in fish. **Fisheries research**, v. 4, p. 259-269, 1986.

MURATORI, M.C.S.; COSTA, A.P.R.; VIANA C.M.; RODRIGUES P.C.; JUNIOR R.L.P. Qualidade sanitária de pescado "in natura". **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116-117, p. 50-54, 2004.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, J.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, p. 108-113, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **The Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard. 8^a ed., 2003.

NEWTON, A.; KENDALL, M.; VUGIA, D.J.; HENAO, O.L.; MAHON, B.E. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 391-395, 2012.

NOVOTNY, L.; DVORSKA, L.; LORENCOVA, A.; BERAN, V.; PAVLIK, I. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. **Veterinárni Medicína**, v. 49, n. 9, p. 343-358, 2004.

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

OREN, O.H. **Aquaculture of grey mullets**, Nova York, Cambridge University Press. 507p., 1981.

PATHANIA, A.; MCKEE, S. R.; BILGILI, S. F.; SINGH, M. Antimicrobial activity of commercial marinades against multiple strains of *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 214-217, 2010.

PAREJO, C.B. **Peces marinos. Tecnología de cultivo**. Madri, Mundi-Prensa, 148p. 1991.

PORTO, E. Microbiologia de carnes. In: CASTILLO, C. J. C. Qualidade da carne. São Paulo: Varela, 2006. p. 101-131.

PORTO, R.G. Consumidor final de carnes: características e hábitos em Pelotas/RS. **SIC – Serviço de informação da carne**. 2011. Disponível em <http://www.ica.ufmg.br/gemisa/attachments/article/48/Pesquisa_MercadoCarn ePelotas.pdf>. Acesso em: março/2019.

POZZO, D. M.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, H. I.; ALVES, H. A.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 23, p. 1-6, 2011.

PRUDENT, D.; PERINEAU F.; BESSIERE, J. M.; MICHEL, G. M.; BACCOU, J. C. (1995) Analysis of the Essential Oil of Wild Oregano from Martinique (*Coleus aromaticus*Benth.) - Evaluation of Its Bacteriostatic and Fungistatic Properties, **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 2, 165-173, 1995.

QUELHAS, I.; PETISCA, C.; VIEGAS, O.; MELO, A.; PINHO, O.; & FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Effect of green tea marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines and sensory quality of pan-fried beef. **Food Chemistry**, v. 122, p. 98-104, 2010.

REES, L.P.; MINNEY, S.F.; PLUMMER, N.T.; SLATER, J.H.; SKYRME, D.A. A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 9, p. 303-307, 1993.

REIS, E.G; VIEIRA, P.C.; DUARTE, V.S. Pesca artesanal de teleósteos no estuário da Lagoa dos Patos e costa do Rio Grande do Sul. **Atlântica**, v. 16, p. 69-86, 1994.

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

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v. 6, p. 24-29, 1983

SILVEIRA, S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais de óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de Louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo fresco**. 2012, 215f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SIMÕES C.M.O.; SPITZER V. Óleos voláteis, p.387-416. In: Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mentz L.A. & Petrovick P.R. (Eds), **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, UFRGS, Porto Alegre. 1999.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; SOKOVIC, M.; MARIN, D. P.; BRKIC, D.; GRIENSVEN, D. L. J. L. Chemical

composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. **Food**, v. 1, n. 2, p. 220-226, 2008.

SNOUSSI, M.; CHAIEB, K.; ROUABHIA, M.; BAKHROUF, A. Quantitative study, identification and antibiotics sensitivity of some Vibrionaceae associated to a marine fish hatchery. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 289-293, 2006.

SNOUSSI, M; HAJLAOUI H; NOUMI, E.; USAI, D.; SECHI, L. A.; ZANETTI, S.; BAKHROUF, A. *In-vitro* anti-Vibrio spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.12, p.3071-6, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11274-008-9811-6.pdf>. Acesso em 11 jan. 2018

SNOUSSI, M.; NOUMI, E.; TRABELSI, N.; FLAMINI, G.; PAPETTI, A and DE FEO, V. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. strains. **Molecules** 2, v. 20 n. 8 p. 14402-14424, 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/8/14402>. Acesso em: 04 jan. 2018.

SNOUSSI, M; DEHMANI, A; NOUMI, E; FLAMINI, G; PAPETTI, A. Chemical composition and antibiofilm activity of *Petroselinum crispum* and *Ocimum basilicum* essential oils against *Vibrio* spp. strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 90 p. 13-21, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088240101500176X> Acesso em: 04 jan. 2018.

SOKOVIĆ, M.; MARIN, P.D.; BRKIĆ, D.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria. **Food**. v. 1, n. 2, p. 220-226, 2008.

SOLOMON, M. R. **Consumer Behavior**. 3rd. New Jersey: Prentice Hall, 1996.

STATISTIX®. **Statistix 8 analytical software**. Tallahassee, Florida, USA, 2003.

TRAJANO, V. N.; LIMA E. O.; SOUZA E. L.; TRAVASSOS A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias

contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29 n. 3, p. 542-545, 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.

VERNIN, G.; LAGEOT, C.; GAYDOU, E. M.; PARKANYI, C. Analysis of essential oil of *Lippiagraveolens* HBK from El Salvador. **Flavour Fragrance Journal**, v. 16, p. 219-226, 2001.

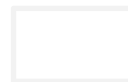
VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. Livraria Varela, 2004. 380 p.

VIEIRA, J.P.; CASTELLO, J.P.; PEREIRA, L.E. Ictiofauna. In: SEELIGER, U.; ODEBRECHT, C.; CASTELLO, J.P. **Os Ecossistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil**. Editora Ecoscientia, 1998, p. 60-68.

VIUDA-MARTOS, M. RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVARES, J.A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 526-531, 2008.

XIE Z.Y.; HU, C.Q.; CHEN, C.; ZHANG, L.P.; REN, C.H. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 202-207, 2005.

YANO, Y; SATOMI, M.; OIKAWA, H. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 6-11, 2006.



Anexos

Anexo A - Termo de consentimento para análise sensorial e de consentimento livre e esclarecido

Pelo presente consentimento livre e esclarecido, eu, _____, declaro que fui convidado a participar da pesquisa “Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Ocimum basilicum* e sua aplicação em filés de *Mugil plantamus*” e que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, dos objetivos, da justificativa e os procedimentos, sobre a participação voluntária e com direito a desistência de participar e retirar meu consentimento, não havendo riscos, sendo os resultados para fins acadêmicos e que somente assinarei o termo após ter sido esclarecido e concordar com a pesquisa, através de encontro individual e livre de qualquer forma de constrangimento e coerção.

PROCEDIMENTOS: Fui informado(a) de que receberei amostras De pescados marinado em óleo essencial de orégano, para que eu avalie suas características sensoriais.

RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES: Fui informado(a) que não há riscos mencionados na bibliografia sobre a ingestão de óleos essenciais e reações alérgicas.

BENEFÍCIOS: O benefício de participar da pesquisa relaciona-se ao fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA: A minha adesão à pesquisa ocorrerá de forma voluntária e nenhum tipo de penalidade será aplicado caso não seja do meu interesse participar.

CONFIDENCIALIDADE: Estou ciente que a minha identidade permanecerá confidencial durante o estudo e que os dados coletados só serão utilizados para fins de pesquisa.

CONSENTIMENTO: Ciente das informações citadas anteriormente, eu concordo em participar da avaliação sensorial dos produtos elaborados na pesquisa.

PELOTAS, ___ de _____ de _____

PELOTAS, ___ de _____ de _____

___ **Greyce Silveira Mello**

(Pesquisadora responsável)

Assinado por:

(Participante da pesquisa)

Anexo B - Ficha de intenção de compra

NOME: _____ **DATA:** ___ / ___ / ___

FAIXA ETÁRIA: () menor 19 anos () 19 a 25 anos () 26 a 35 anos () 36 a 45 anos () maior 45 anos

SEXO: () Masculino () Feminino

Você está recebendo uma amostra de filé de tainha marinado em óleo essencial de orégano

Por favor, prove a amostra e avalie utilizando a escala abaixo se você compraria ou não este produto, marque a posição que melhor avalie seu julgamento.

- () Decididamente eu compraria
- () Provavelmente eu compraria
- () Talvez sim/ Talvez não
- () Provavelmente eu não compraria
- () Decididamente eu não compraria
- () Compraria ocasionalmente
- () Compraria somente se fosse forçado

Comentários: _____

—

Anexo C - Ficha hedônica

NOME: _____ **DATA:** ___ / ___ / ___

FAIXA ETÁRIA: () < 19 anos () 19 a 25 anos () 26 a 45 anos () > 45 anos

SEXO: () Masculino () Feminino

Você está recebendo uma amostra de filé de tainha marinado em óleo essencial de orégano.

Por favor, prove a amostra e avalie utilizando a escala abaixo para dizer o quanto você gostou ou desgostou do produto, marque a posição que melhor reflita o seu julgamento.

- () Gostei extremamente
- () Gostei muito
- () Gostei moderadamente
- () Gostei ligeiramente
- () Não gostei, nem desgostei
- () Desgostei ligeiramente
- () Desgostei moderadamente
- () Desgostei muito
- () Desgostei extremamente

Comentários: _____

Anexo D - Ficha de pesquisa de mercado

NOME: _____ **DATA:** ___ / ___ / _____

FAIXA ETÁRIA: () < 19 anos () 19 a 25 anos () 26 a 45 anos () > 45 anos

SEXO: () Masculino () Feminino

ESCOLARIDADE: _____

Análise sensorial de pescado marinado em óleo essencial de orégano.

Qual o tipo de carne que você mais consome?

Você tem dificuldades em consumir alimentos com condimentos? Qual é a sua dificuldade? _____

Você costuma consumir pescado? () sim () não

Se não, Por que? _____

Com que frequência você consome pescados? () diariamente () semanalmente () mensalmente () eventualmente () nunca