

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS PARA CONTROLE DE *Vibrio parahaemolyticus* MULTIRRESISTENTES EM PESCADOS

PALOMA PEREIRA DE ÁVILA¹; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA²; ADRIANA FÃO CARLOTO³; ADRIELE DE AZAMBUJA FAGUNDES⁴; GRACIELA VOLZ LOPES⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – palomaavila92@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – adrianafcarloto@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – adrieleazambuja97@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Vibrio spp. é uma bactéria Gram-negativa encontrada em águas marinhas e costeiras e uma das principais causas de gastroenterite e mortes associadas ao consumo de pescado em todo o mundo (Silva et al., 2021). As doenças causadas por *Vibrio* spp. variam desde diarreia branda, por ingestão de *V. parahaemolyticus*, até enterite severa e septicemia com alta taxa de mortalidade, ocasionadas por *V. vulnificus*. Em alguns países, onde peixes e frutos do mar, exceto moluscos bivalves, são comumente consumidos crus, esses alimentos são comumente associados à gastroenterite por *V. parahaemolyticus* (DePaola & Toyofuku, 2014).

Nos últimos anos é notável o aumento na busca por métodos alternativos na conservação de pescados, objetivando garantir a qualidade e a segurança destes alimentos. Conservantes naturais vêm ganhando destaque e recebendo considerável atenção por parte da comunidade científica, dos consumidores, da indústria, bem como dos setores da saúde, apresentando potencial como método de ampla ação antimicrobiana e de baixo custo. Dentre os conservantes naturais, os óleos essenciais (OE) de diversas fontes têm sido objeto de estudo, alguns com potencial de utilização em produção e processamento de pescados. Os compostos bioativos apresentam diferentes mecanismos de ação de acordo com o grupo de microrganismos (Baptista et al., 2020).

Os OE podem ser utilizados como conservantes de pescados em concentrações que variam de 0,1 a 1%. Mais altas concentrações, na maioria dos casos, afetam negativamente as propriedades sensoriais do produto (Hussain et al., 2021). Estudos acerca do desenvolvimento de novos produtos e embalagens inteligentes, devem levar em consideração a aceitação dos mesmos, bem como intenção de compra por parte dos consumidores, para com isso, afirmarem perspectivas de aplicação reais.

Tendo em vista a patogenicidade e a necessidade de controle de *Vibrio* spp. em pescados, a busca por conservantes naturais e a perspectiva de incorporação de OEs a embalagens, o presente estudo tem como objetivos: (1) identificar as espécies de *Vibrio* spp. que estão presentes em pescados comercializados na região sul do Rio Grande do Sul; (2) caracterizar o perfil de resistência dos isolados patogênicos frente aos antimicrobianos sintéticos comumente utilizados; (3) avaliar a ação de óleos essenciais contra *Vibrio* spp. patogênicos e multirresistentes “*in vitro*” e (4) avaliar a intenção de compra dos produtos adicionados dos OEs com ação antimicrobiana.

2. METODOLOGIA

Um total de 50 amostras de pescados foi coletado em três diferentes peixarias do Mercado Público da cidade de Pelotas, sendo 25 de peixes e 25 de camarões. Os pescados foram adquiridos em suas embalagens originais e encaminhados imediatamente ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo. O método para a detecção de *Vibrio* spp. em amostras de pescados foi o descrito no *Bacteriological Analytical Manual – BAM* (Kaysner *et al.*, 2004). A extração do DNA genômico foi realizada conforme o protocolo descrito por Green e Sambrook (2012). A identificação molecular de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* foi confirmada pela presença do gene *tlh* e *vvhA*, respectivamente, conforme Kaysner *et al.* (2004).

Os isolados de *Vibrio* spp. foram testados quanto à suscetibilidade a antimicrobianos contra 12 agentes distintos. O teste de disco-difusão em ágar foi realizado e avaliado de acordo com as especificações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2018) e a classificação quanto à resistência realizada conforme a tabela de Pontos de Corte Clínicos do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* - EUCAST (2024). Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: Piperacilina-tazobactam (30 µg), Cefotaxima (5 µg), Ceftazidima (10 µg), Meropenem (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Levofloxacina (5 µg), Pefloxacina (5 µg), Eritromicina (15 µg), Doxiciclina (XX µg), Tetraciclina (30 µg), Sulfametoxazol-trimetoprima (23,75 - 1,25 µg) e Azitromicina (15 µg) (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil). *Vibrio parahaemolyticus* ATCC® 17802 foi utilizada como uma cepa de referência. A multirresistência (MDR) foi definida como resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (CLSI 2018).

Os OEs de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), *Citrus aurantium* (laranja-azedo), *Citrus limon* (limão-siciliano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Curcuma longa* (cúrcuma), *Salvia officinalis* (sálvia), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) [Lazlo, Belo Horizonte], *Mintostachys mollis* (muña) e *Piper elongatum* (matico) [Pukllay Herbolaria EIRL] foram adquiridos comercialmente e o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* cedido por Thamyres César de Albuquerque Sousa, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, PPGCTA da Universidade Federal de Pelotas (dados não publicados). O teste de disco-difusão com os óleos essenciais foi realizado e a ação classificada conforme Mello *et al.* (2020).

Por fim, foi realizada uma pesquisa de intenção de compra de pescados óleos essenciais como conservantes. Foram selecionados os óleos que tiveram forte ação antimicrobiana “*in vitro*” frente aos isolados de *Vibrio*. A pesquisa foi realizada através de um questionário online via *Google forms*, aplicado a 109 participantes que consentiram em prosseguir com o estudo. Os entrevistados responderam à seguinte pergunta: “Dentre as opções de óleos incorporados à pescados, qual você compraria? (pode escolher mais de uma opção)”. Os resultados foram agrupados de acordo com a frequência de respostas, apresentadas em proporção.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada a presença de *V. parahaemolyticus* em 6 amostras (12%), totalizando 8 isolados, nas espécies *Micropogonias furnieri* (corvina) – 2 exemplares, *Carcharhinus* spp. (cação), *Mugil platanus* (tainha) e *Farfantpnaeus paulensis* (camarão-rosa) – 2 exemplares. *Vibrio vulnificus* não foi isolado de nenhuma amostra.

Este foi o primeiro relato da ocorrência do patógeno em *Carcharhinus* spp., no entanto, existem evidências científicas do isolamento de *V. parahaemolyticus* nas espécies *M. platanus* e *F. paulensis* no estuário da Lagoa dos Patos em 2013 (Milan et al., 2015) e de *M. furnieri* e *M. platanus* em 2014 (da Rosa et al., 2016). No Brasil, a prevalência de *V. parahaemolyticus* em pescado é desconhecida, provavelmente pela ausência de diagnóstico e subnotificação dos casos de gastroenterites, ausência de uma vigilância ativa nos casos de infecção e falta de diagnóstico clínico com isolamento e determinação dos agentes infecciosos envolvidos.

Cinco dos oito isolados foram classificados como multirresistentes, sendo quatro destes de *F. paulensis* e um de *M. furnieri*. O resultado pode ser apontado como crítico, uma vez que a presença de cepas de *V. parahaemolyticus* multirresistentes em pescados representa um risco ainda maior à saúde do consumidor, pois pode dificultar o tratamento de infecções causadas pela ingestão dos alimentos contaminados (Straten et al., 2023).

Os OE de capim-limão, cravo-da-índia, tomilho, melaleuca apresentaram forte ação antimicrobiana frente aos isolados obtidos, e frente a cepa de referência. A inibição de *V. parahaemolyticus* por OE de cravo-da-índia, tomilho e melaleuca já foi anteriormente relatada por Elexson et al., (2016), Tomazelli et al., (2020), Zheng et al. (2020), respectivamente. No entanto, é inédita a ação inibitória de OE de capim-limão frente a isolados deste microrganismo.

O principal resultado obtido na pesquisa de intenção de compra dos pescados incorporados com OE foi o OE de tomilho (53,2%), seguido do OE de capim-limão (44,1%) e menor aceitação do OE de cravo-da-índia (17,1%) e OE de melaleuca (11,7%) nestes produtos. Os resultados são relevantes para a escolha do óleo que será aplicado nas etapas posteriores do estudo.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que *V. parahaemolyticus* ocorre em diferentes espécies de pescado na região Sul do Brasil, sendo a maioria dos isolados multirresistentes. Óleos essenciais de capim-limão, cravo-da-índia, tomilho e melaleuca possuem forte atividade antimicrobiana contra estes isolados. A pesquisa de intenção de compra aponta os óleos essenciais de tomilho, seguido de capim-limão, para uma aplicação mais assertiva a embalagem a ser desenvolvida, demonstrando legítima perspectiva de aplicação para controle de *Vibrio* não colérico em pescados e aceitação dos consumidores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAPTISTA, R. C.; HORITA, C. N.; SANT'ANA, A. S. Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. **Food research international**, v. 127, p. 108762, 2020.

CLSI. M100: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 32nd edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania; 2023. Acesso em: 13 set. 2024. Online. Disponível em: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>.

ELEXSON, N.; RUKAYADI, Y.; NAKAGUCHI, Y.; NISHIBUCHI, M.; SON, R. Evaluation of cloves (*Syzygium aromaticum*) against antibiotics resistant *Vibrio parahaemolyticus* on seafood. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 5, 2016.

EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method**, v. 12, 2024. Acesso em: 13 set. 2024. Online. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2024_manuals/Manual_v_12.0_EUCAST_Disk_Test_2024.pdf

HUSSAIN, M. A.; SUMON, T. A.; MAZUMDER, S. K.; ALI, M. M.; JANG, W. J.; ABUALREESH, M. H.; HASAN, M. T. Essential oils and chitosan as alternatives to chemical preservatives for fish and fisheries products: A review. **Food Control**, v. 129, p. 108244, 2021.

KAYSNER, C. A.; DEPAOLA JR, A.; JONES, J. *Vibrio*. U.S. **Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual**, Chap. 9, 2004.

MELLO, G. S., ROSA, J. F., SILVEIRA, D. R., VIVIAN, P. G., CERESER, N. D., & TIMM, C. D. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* and *Ocimum basilicum* against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* and addition of these oils on *Mugil platanus* fillets. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 46, n. 4, 2020.

MILAN, C.; SILVEIRA, D. R.; DA ROSA, J. V.; TIMM, C. D. *Vibrio parahaemolyticus* isolados de pescados do estuário da Lagoa dos Patos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 2, p. 151-155, 2015.

da ROSA, J. V.; DA 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.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V.C.A., DE ARRUDA SILVEIRA, N.F., TANIWAKI, M. H., GOMES, R.A. R., & OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher: São Paulo, 6^a ed. 2021.
GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning**. Cold Spring ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2012.

STRATEV, D.; FASULKOVA, R.; KRUMOVA-VALCHEVA, G. Gergana. Incidence, virulence genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood. **Microbial Pathogenesis**, v. 177, p. 106050, 2023.

TOMAZELLI, O.; KUHN, F.; PADILHA, P. J. M.; VICENTE, L. R. M.; COSTA, S. W.; BOLIGON, A. A.; CASTELLVÍ, S. L. Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 311-317, 2017.

DE PAOLA, A.; TOYOFUKU, H. **Safety of food and beverages: seafood**. 2014. Acesso em: 13 set. 2024. Online. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012378612800281X?via%3Dihub>

ZHENG, X., FEYAERTS, A. F., VAN DIJCK, P., & BOSSIER, P. Inhibitory activity of essential oils against *Vibrio campbellii* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1946, 2020.