

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BARRA MANSA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM SAÚDE (NUPES)**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DE VINAGRE  
AROMÁTICO COMO SANITIZANTE PARA *SASHIMI***

Lucas de Oliveira Moreira  
Professor Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi

**Barra Mansa-RJ**

**2023**

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BARRA MANSA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM SAÚDE (NUPES)**

**Lucas de Oliveira Moreira**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE USO DE VINAGRE  
AROMÁTICO COMO SANITIZANTE PARA *SASHIMI***

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao Centro Universitário de Barra Mansa como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Bacharel em Biologia

Orientador: Prof. Dr. Victor Maximiliano Reis  
Tebaldi

**Barra Mansa-RJ**

**2023**

## RESUMO

Alimentos à base de pescado cru, originários da cultura japonesa, são responsáveis por inúmeros surtos de toxinfecções, tornando necessárias medidas rigorosas de segurança alimentar. Óleos essenciais ou produtos de sua associação podem desempenhar funções antimicrobianas, tornando-os uma opção viável no combate a patógenos. Este estudo visou avaliar as condições higiênico-sanitárias e a eficácia de soluções de vinagre aromático como sanitizantes em amostras de *sashimi* elaborados a partir de filé de tilápia. Os filés de tilápia foram fatiados em lascas para obtenção dos *sashimis*. A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos foi realizada em Ágar Padrão para Contagem (PCA). Não foi detectada a presença de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* satisfazendo o padrão estabelecido pela RDC nº 331 de 2019. As soluções de vinagre aromático foram elaboradas com vinagre comercial acrescido de Tween 80 (0,5%) em associação com óleo essencial de orégano a 0,25% e 0,5%, respectivamente. Para a avaliação da atividade antimicrobiana das soluções, as amostras de *sashimi* foram imersas por 30 segundos e 1 minuto, respectivamente. Maiores valores de redução da microbiota total nas amostras de *sashimi* foram observados nos tratamentos com vinagre 4% + óleo essencial de orégano 0,25% por 1 minuto (1,18 log); e vinagre a 4% por 30 segundos (1 log), respectivamente. A atividade antimicrobiana foi demonstrada para as soluções de vinagre e vinagre aromático, requerendo mais estudos para prospecção de outros óleos essenciais que possam ser empregados em associação com o vinagre 4%, bem como verificação de outras variáveis que podem influenciar sua eficácia.

**Palavras-chave:** óleo essencial, atividade antimicrobiana, vinagre aromático, *sashimi*.

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de peixe no Brasil aumentou nos últimos anos e excede 12 kg/habitante/ano, quantidade mínima recomendada pela Organização Mundial da Saúde (SNA, 2015). Isto é devido principalmente à sua qualidade nutricional. O peixe é uma excelente fonte de proteína animal, possui ação anti-inflamatória e quantidades significativas de magnésio, fósforo e vitaminas A e D (FENG, 2012).

Alimentos à base de pescado cru, como o *sushi* e o *sashimi*, originários da cultura japonesa, vêm ganhando destaque no Brasil (SANTOS et al., 2012) e constitui uma sofisticação gastronômica responsável por incontáveis surtos de toxinfecções.

O nível de contaminação desses dois alimentos com patógenos transmitidos por alimentos pode ser alto devido às técnicas de preparação, portanto, medidas rigorosas de segurança alimentar devem ser consideradas para evitar intoxicação alimentar (PUAH et al., 2017).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC nº 331/2019 (BRASIL, 2019) estabelece padrões microbiológicos para alimentos à base de carnes, pescados e similares crus, o que inclui o *sushi* e o *sashimi*. Esses alimentos, para serem seguros ao consumo

humano, devem respeitar os limites estabelecidos na legislação para *Escherichia coli* ( $10^2$  NMP/g), *Staphylococcus* coagulase positiva ( $10^3$  UFC/g) e ausência de *Salmonella* sp.

Existe um interesse crescente na aplicação de compostos antimicrobianos naturais na indústria de alimentos. Os consumidores estão cada vez mais evitando o consumo de alimentos tratados com produtos químicos. São necessárias alternativas naturais para alcançar um alto nível de segurança em relação aos microrganismos patogênicos de origem alimentar (LINGHAM et al., 2012) e deterioradores. Compostos voláteis naturais, incluindo vinagre e óleo essencial, foram extensivamente investigados e demonstraram atividades antibacteriana e antifúngica (TZORTZAKIS et al., 2011).

Uma solução para prolongar a vida útil do peixe fresco pode ser a aplicação de vinagre. O ácido acético, um ácido orgânico, é o principal agente antimicrobiano ativo no vinagre (MANI-LÓPEZ et al., 2012). À medida que o pH diminui, a inativação do vinagre contra bactérias aumenta devido à sua capacidade de penetrar e romper a membrana celular e acidificar o conteúdo interno da célula (KEENER et al., 2004). No entanto, o baixo teor de ácido acético (4%), que torna o vinagre seguro, também limita sua eficácia. Como consequência, mais estudos podem ser necessários para melhorar a eficiência do vinagre (TZORTZAKIS et al., 2011).

Atualmente há um interesse considerável em extratos e óleos essenciais de plantas aromáticas com atividade antimicrobiana para o controle de microrganismos em alimentos. Alguns estudos têm focado nas propriedades biológicas dos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e orégano (*Origanum vulgare*). Segundo Essawi e Srour (2000), o óleo essencial de *T. vulgaris* é rico em timol, apresentando traços de carvacrol, potentes bactericidas e fungicidas reconhecidos cientificamente. O óleo essencial de orégano possui atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica e, entre elas, o potencial antimicrobiano é de especial interesse (De FALCO et al., 2013). Baser (2008) identificou o carvacrol como o principal responsável por essa atividade biológica.

A combinação eficaz de óleos essenciais e outros agentes conservantes, por exemplo o ácido acético, pode ser reconhecida como uma alternativa promissora para a indústria de alimentos, podendo viabilizar a diminuição de doses de antimicrobianos aplicados para inibir o crescimento microbiano em alimentos (SOUZA et al., 2009).

O estudo visou avaliar a qualidade higiênico-sanitária de amostras de *sashimi* obtidas de filé de tilápia e, posteriormente testar a eficácia de soluções de vinagre aromático como alternativa para sua sanitização.

## **2 METODOLOGIA**

### **Coleta e preparo das amostras**

Amostras de filés de tilápia, adquiridas em uma peixaria da região Sul Fluminense-RJ foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo e imediatamente conduzidas ao Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Barra Mansa, onde foram fatiadas em lascas (*sashimi*) e mantidas em congelador durante todo o experimento. No Laboratório, alíquotas de 25 g de cada unidade experimental dos *sashimis* foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) com posteriores diluições seriadas para as análises de coliformes e contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos. Todas as análises microbiológicas foram conduzidas em duplicata de acordo com ICMSF (2000).

### **Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos**

Empregou-se a técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour Plate*), selecionando-se três diluições e transferindo-as em alíquotas de 1 mL em placas de Petri estéreis. Foram adicionados 20 mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA), previamente fundido e resfriado a 44-46°C. Em seguida o inóculo foi misturado com o meio de cultura por meio de movimentos circulares suaves em forma de “8”. Após solidificação do meio as placas foram incubadas à temperatura de 37°C/48h com posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Esta contagem foi realizada no *sashimi* sem tratamento com vinagre aromático e *sashimi* tratado com vinagre aromático.

### **Enumeração de coliformes totais e termotolerantes**

Para enumeração de coliformes empregou-se a técnica dos tubos múltiplos para a determinação do número mais provável (NMP), transferindo-se alíquotas de 1 mL das diluições para séries de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e incubação a 37°C/24-48 horas. Foram considerados positivos os testes que apresentaram produção de gás nos tubos de Durham. A partir dos tubos positivos de caldo LST foram transferidas alíquotas com alça de níquel-cromo para tubos contendo Caldo Bile Verde Brilhante (VB) e Caldo *Escherichia coli* (EC), para a realização de testes confirmativos para coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. Os tubos contendo caldo VB foram incubados a 37°C/24-48 horas e caldo EC a 45°C/24-48 horas. Foram considerados positivos os testes que apresentaram produção de gás nos tubos de Durham. Para confirmação da presença de *Escherichia coli*, alíquotas foram transferidas com auxílio de alça

bacteriológica dos tubos considerados positivos do caldo EC para placas contendo ágar EMB. Foram consideradas positivas as placas nas quais após a incubação de 37°C/24-48 horas apresentaram formação de colônias pequenas, esféricas, com precipitado negro no centro e brilho verde metálico. Esta contagem foi realizada no sashimi sem tratamento com vinagre aromático e *sashimi* tratado com vinagre aromático.

### **Obtenção do vinagre aromático e avaliação da atividade antimicrobiana**

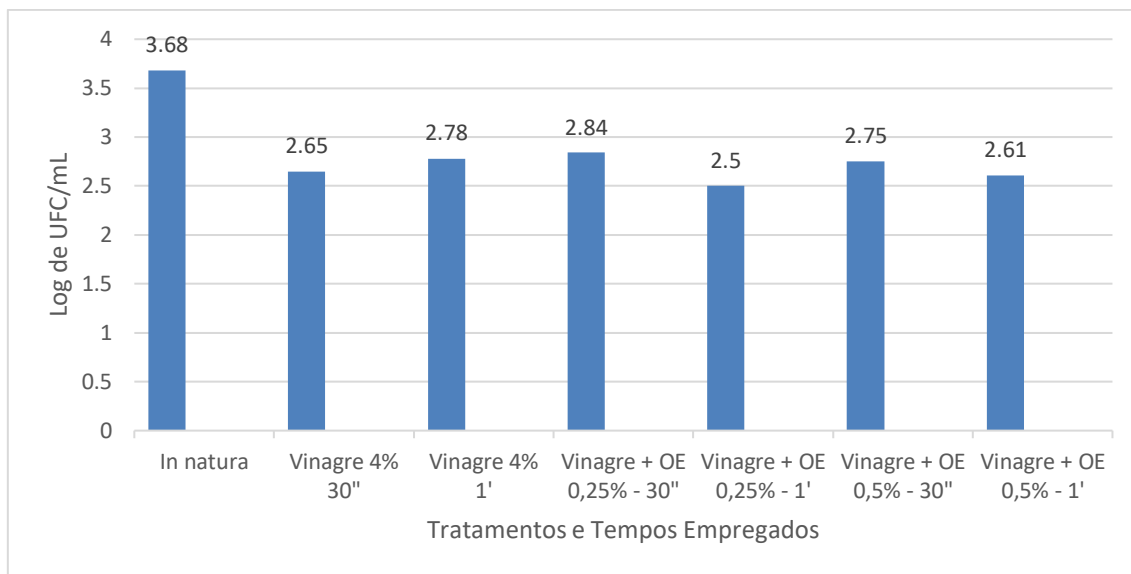
As soluções de vinagre aromático foram preparadas com vinagre (4% de ácido acético) acrescido de Tween 80 (0,5%) em associação com óleo essencial de orégano a 0,25% e 0,5%, respectivamente. Para cada tratamento foi realizado um teste controle constituído por vinagre apenas.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das soluções, as amostras de *sashimi* foram imersas por 30 segundos e 1 minuto, respectivamente, e posterior enxágue com água destilada estéril. A redução logarítmica da população microbiana foi obtida após tratamento com as soluções antimicrobianas, de acordo com Sharma e Anand (2002), para cada tratamento empregado, por meio da seguinte equação:  $\text{Log } N - \text{Log } n$ , em que  $N$  é a concentração inicial da população bacteriana nas amostras ( $T_0$ ) e  $n$  é a contagem de células após tratamento com os compostos antimicrobianos.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da avaliação higiênico-sanitária de amostras de *sashimi in natura* e diminuição da microbiota total das amostras tratadas com vinagre e vinagre aromático estão representados na Figura 1.

Não foi detectada a presença de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* nas amostras de *sashimi*. No entanto, foi verificada a presença de coliformes totais ( $2,17 \times 10^2$  NMP). Esses valores estão em conformidade com os padrões estabelecidos pela RDC nº 331/2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que não define limites para coliformes totais em pescados crus. De acordo com Antunes et al. (2016) e Furlaneto-Maia (2006), a presença de coliformes totais indica a possibilidade de contaminação através do processamento da tilápia em filé, devido a práticas de sanitização ineficientes relacionadas a alta capacidade de colonização desses microrganismos.



**FIGURA 1.** Redução logarítmica da microbiota total de *sashimis* tratados com soluções de vinagre e vinagre aromático.

Os resultados indicaram maiores reduções da microbiota total nas amostras de *sashimi* nos tratamentos com vinagre 4% + óleo essencial de orégano 0,25% por 1 minuto; e vinagre a 4% por 30 segundos, respectivamente.

A utilização de baixa concentração de ácido acético (4%) em vinagre foi suficiente para promover a redução da microbiota total presente nas amostras de *sashimi*, como expresso por Utyama (2007) que avaliou a diluição inibitória máxima do ácido acético contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Nos testes realizados utilizando-se apenas vinagre 4% por 30 segundos como sanitizante, foi observada redução média de 1 ciclo logarítmico da microbiota total do *sashimi*, evidenciando sua capacidade antimicrobiana, que ocorre por meio de suas moléculas, responsáveis por acidificar o meio intracelular microbiano, causando efeitos inibitórios (LINGHAM, T. et al., 2012) e tóxicos, afetando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MANI-LÓPEZ, et al., 2012).

O tratamento com solução de vinagre aromático contendo 0,25% de óleo essencial de orégano por 1 minuto resultou em redução média de 1,18 ciclo logarítmico da microbiota total, valor superior ao obtido com vinagre apenas, resultado em conformidade com os valores mínimos de redução relatados por Da Silva Santos et al. (2017). O óleo essencial de orégano possui como principais constituintes os fenóis lipofílicos carvacrol e timol, compostos isômeros caracterizados como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (BASER, 2008). Estes compostos possuem atração à membrana externa de Gram-negativos e à membrana citoplasmática devido a presença de lipídeos em sua constituição, locais onde estes fenóis possuem maior efeito, atuando

como antimicrobianos através de sua permeabilização e despolarização (ALMEIDA, 2015), causando a interrupção de processos vitais para o metabolismo microbiano que necessitam de enzimas, provocando a morte celular (BONA et al., 2012).

Apesar de diversos estudos comprovarem a alta eficiência do óleo essencial de orégano como um bom sanitizante (FALLEH et al., 2020), os resultados preliminares obtidos, mesmo dentro dos padrões mínimos relatados em literatura, apresentaram valores menores que os observados por PATEIRO et al. (2021). Este fato pode ser explicado por diversos fatores, como concentrações, tempo de exposição ou as interações entre vinagre e óleo essencial de orégano (RHAYOUR et al., 2003), ou mesmo a diminuição da eficácia por ter sido empregado diretamente na matriz alimentar, podendo desta forma reagir com alguns de seus componentes. Outra possibilidade seria emulsão óleo essencial/vinagre, esta variável também pode interferir na atividade antimicrobiana pois surfactantes podem afetar a atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos (GOMEZ-LOPEZ et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008)

#### **4 CONCLUSÃO**

A atividade antimicrobiana foi demonstrada para o vinagre e vinagre aromático neste estudo preliminar como fonte alternativa de sanitizante para produtos alimentícios, especialmente alimentos para consumo *in natura*, como o *sashimi*. Porém, são necessários estudos adicionais para a melhor compreensão dos mecanismos relacionados a inibição microbiana pelo vinagre em associação com óleo essencial, bem como a prospecção de outros óleos essenciais, possibilitando o desenvolvimento de novas metodologias aplicáveis e úteis.



## REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. R., OLIVEIRA, G. L., SALEMA, R. B., & SOUZA, L. T. D. (2016). Pesquisa de coliformes em carne bovina comercializada no município do Vale do Jequitinhonha MG. **Higiene Alimentar**, 30(256/257), 82-86.

Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/08/1533/separata-82-86.pdf>

CAN BASER, K. H. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current pharmaceutical design**, 14(29), 3106-3119. <https://doi.org/10.2174/138161208786404227>

BRASIL. Ministério da Saúde. (2019, dezembro 26). Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Resolução - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília

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**. 2019.

DA SILVA SANTOS, C. H., PICCOLI, R. H., & TEBALDI, V. M. R. (2017). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 76, 1-8.

Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/33539/32371>

DOS SANTOS RODRIGUES, J. B., DE CARVALHO, R. J., DE SOUZA, N. T., DE SOUSA OLIVEIRA, K., FRANCO, O. L., SCHAFFNER, D., ... & MAGNANI, M. (2017). Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, 73, 1237-1246.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.043>

ESSAWI, T., & SROUR, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of ethnopharmacology**, 70(3), 343-349.

[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00187-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00187-7)

FALLEH, H., JEMAA, M. B., SAADA, M., & KSOURI, R. (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food Chemistry**, 330, 127268.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>

HSIN-I FENG, C. (2012). The tale of sushi: History and regulations. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 11(2), 205-220.

<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00180.x>

HAWKINS, J.L.; VIMINI, B.; SCHWARZ, J.G.; NICHOL, P.; PARVEEN, S. Application of Antimicrobial Agents via Commercial Spray Cabinet To Inactivate *Salmonella* on Skinless Chicken Meat. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p.569-573, 2016. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-248>

FURLANETO-MAIA, L., & CORRÊA, D. S. (2006). Avaliação Microbiológica de componentes de pratos árabes. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, 12(4). <https://doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v12i4.440>

GOMEZ-LOPEZ, A., ABERKANE, A., PETRIKKOU, E., MELLADO, E., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L., & CUENCA-ESTRELLA, M. (2005). Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *Journal of clinical microbiology*, 43(3), 1251-1255. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1251-1255.2005>

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. Microorganismos De Los Alimentos: su significado y metodos de emumeración. 2.ed. **Zaragoza: Acribia**. 2000. 439p.

KEENER, K.M.; BASHOR, M.P.; CURTIS, P.A.; SHELDON, B.W.; KATHARIOU, S. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p.105–116, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00060.x>

LINGHAM, T.; BESONG, S.; OZBAY, G.; LEE, J.L. Antimicrobial Activity of Vinegar on Bacterial Species Isolated from Retail and Local Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Processing & Technology**, S11-001, 2012. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.S11-001>

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v.45, p.713–721, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>

NASCIMENTO, F. R., CARDOSO, M. G., SOUZA, P. E., LIMA, R. K., SALGADO, A. P. S. P., & GUIMARÃES, L. G. L. (2008). Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, 38, 503-508. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000300015>

PATEIRO, M., MUNEKATA, P. E., SANT'ANA, A. S., DOMÍNGUEZ, R., RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., & LORENZO, J. M. (2021). Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, 337, 108966. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108966>

PUAH, S. M., CHUA, K. H., & TAN, J. A. M. A. (2017). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* in ready-to-eat sushi and sashimi. **Tropical Biomedicine**, 34(1), 45-51. Disponível em: <https://msptm.org/files/Vol34No1/045-051-Jin-Ai-Mary-Anne-Tan.pdf>

RHAYOUR, K., BOUCHIKHI, T., TANTAOUI-ELARAKI, A., SENDIDE, K., & REMMAL, A. (2003). 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**, 15(5), 356-362. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9698611>

SANTOS, A. A., SIMÕES, G. T. N., CRUZ, M. M., FERREIRA, N. S. S., LIMA, R. T. C., & TUNON, G. I. L. (2012). Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**, 8(3 (a)).

SAS Institute, Inc. (2002). Gary, IN. Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Appel KF, Gram L (2000). The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification. **Aquaculture** 182 (1-2):1–15.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00250-1)

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. **Food Control**, v.13, n.6-7, p.469–77, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8)

DA SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., DE ARRUDA SILVEIRA, N. F., TANIWAKI, M. H., GOMES, R. A. R., & OKAZAKI, M. M. (2017). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. **Editora Blucher**.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA – SNA. Consumo de pescado no Brasil está abaixo do recomendado pela OMS. [updated 01.09.2015]. 2015. Disponível em: <http://sna.agr.br/consumo-de-pescado-no-brasil-esta-abaixo-dorecomendado-pela-oms/>. Acesso em: 11 de novembro de 2015.

TZORTZAKIS, N.G.; TZANAKAKI, K.; ECONOMAKIS, C.D. Effect of Origanum Oil and Vinegar on the Maintenance of Postharvest Quality of Tomato. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p.974-982, 2011. DOI: 10.4236/fns.2011.29132

UTYAMA, I. K. (2007). Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 4(2).  
<http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/16845>

WANG, C.Y. Maintaining Postharvest Quality of Raspberries with Natural Volatile Compounds. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, n.8, 2003, p. 869-875.  
<https://doi.org/10.1046/j.0950-5423.2003.00758.x>