



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

GEANY TARGINO DE SOUZA PEDROSA

EFICÁCIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CITRUS* SPP. APLICADOS ISOLADOS
OU EM COMBINAÇÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO MODERADO
NO CONTROLE DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DETERIORANTES EM
SUCOS DE FRUTAS

JOÃO PESSOA

2019

GEANY TARGINO DE SOUZA PEDROSA

**EFICÁCIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CITRUS* SPP. APLICADOS ISOLADOS
OU EM COMBINAÇÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO MODERADO
NO CONTROLE DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DETERIORANTES EM
SUCOS DE FRUTAS**

.

JOÃO PESSOA

2019

GEANY TARGINO DE SOUZA PEDROSA

**EFICÁCIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *CITRUS* SPP. APLICADOS ISOLADOS
OU EM COMBINAÇÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO MODERADO
NO CONTROLE DE BACTÉRIAS AUTÓCTONES DETERIORANTES EM
SUCOS DE FRUTAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – *Campus I*, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Marciane Magnani

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P372e Pedrosa, Geany Targino de Souza.

Eficácia de óleos essenciais de Citrus spp.
aplicados isolados ou em combinação com tratamento
térmico moderado no controle de bactérias autóctones
deteriorantes em sucos de frutas / Geany Targino de
Souza Pedrosa. - João Pessoa, 2019.
135 f.

Orientação: Marciane Magnani.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Óleos essenciais - Citrus spp. 2. Calor moderado.
3. Citometria de fluxo. 4. Limiares sensoriais. 5.
Sucos de frutas. I. Magnani, Marciane. II. Título.

UFPB/BC

CDU 665.52(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia



Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA

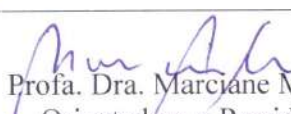
ATA DE DEFESA DE TESE

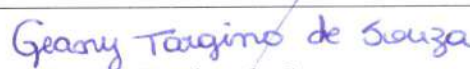
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Aos trinta dias do mês de julho do ano de dois mil e dezenove, no Centro de Tecnologia, desta Universidade, às 14:00 horas, reuniu-se a Banca Examinadora composta pela Profa. Dra. Marciane Magnani, orientadora do trabalho e presidente da Banca, Dra. Graciele da Silva Campelo (Membro Interno/UFPB), Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva (Membro Interno/UFPB), Dr^a. Jailane de Souza Aquino (Membro Externo ao programa/UFPB) e Dr^a Mônica Tejo Cavalcanti (Membro Externo/UFPB). A reunião teve por objetivo julgar o trabalho da estudante **Geany Targino de Souza Nº 2015113971**, sob o Título “EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRUS spp. APLICADOS ISOLADOS OU EM COMBINAÇÃO COM TRATAMENTO TÉRMICO MODERADO FRENTE BACTÉRIAS AUTÓCTONES EM SUCOS DE MAÇÃ E LARANJA”. Os trabalhos foram abertos pela Profa. Dra. Marciane Magnani. A seguir foi dada a palavra a estudante para apresentação do trabalho. Cada Examinador(a) arguiu a doutoranda, com tempos iguais de arguição e resposta. Terminadas as arguições, procedeu-se o julgamento do trabalho, concluindo a Banca Examinadora por sua APROVADA (Aprovação ou reprovação). Atendidas as exigências da Resolução nº 56/2014/CONSEPE que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, e nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente Ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela doutoranda.

João Pessoa, 30 de julho de 2019.

Se houver alteração no título do trabalho, informar o no título abaixo:


Profa. Dra. Marciane Magnani
Orientadora e Presidente


Geany Targino de Souza
Doutoranda


Prof.ª Dra. Graciele da Silva Campelo
(Membro Interno/UFPB)


Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva
(Membro Interno/UFPB)


Prof.ª Dr.ª Jailane de Souza Aquino
(Membro Externo/UFPB)


Prof.ª Dr.ª Mônica Tejo Cavalcanti
(Membro Externo/UFPB)

A **Deus**, por tudo que representa em minha vida.
A minha mãe, **Maria Goretti**, exemplo de amor, força e fé.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por Seu misericordioso amor, pelas vitórias alcançadas, por me dar força e coragem nos momentos de dificuldades e por ser o Maior Mestre. A Ti Senhor toda honra e toda glória!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, pelo apoio a educação e a ciência.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pelo suporte, estrutura e incentivo à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB, seu corpo docente e a seus funcionários, Lindalva e Fernanda, pelo apoio, gentileza e presteza.

À professora Dra. Marciane Magnani, por sua orientação e ensinamentos, por acreditar em meu potencial, pelo exemplo de profissional, por sua amizade, confiança, dedicação, disponibilidade e momentos compartilhados. Minha gratidão!

Ao professor Dr. Rafael Pagán, por sua orientação durante a realização do Doutorado, pelos ensinamentos, contribuições, apoio, disponibilidade e pelos bons momentos de convívio.

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, por suas contribuições e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Ciências da Saúde (CCS) - UFPB para a realização das análises de Citometria de fluxo (CF).

À professora Dra. Janneyre Maciel, por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Tecnologia (CT) - UFPB, para a realização de algumas análises deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lúcio Castellano e a profa. Dra. Jossana Sousa Guedes, pelo auxílio, apoio e conhecimentos compartilhados sobre CF.

Aos professores Dr. Fabio Silva, Dra. Graciele Borges, Dra. Jailane Aquino e Dra. Mônica Tejo, membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições e disponibilidade.

Ao meu pai, Edvaldo Souza (*in memoriam*) por ter me ensinado a sempre acreditar e lutar pelos meus objetivos, por todos os anos vividos nos quais compartilhamos muito amor, respeito e carinho. Hoje apesar da ausência física, sinto-me muito feliz por estar realizando um sonho em comum.

À minha mãe, Maria Goretti Targino, o meu maior tesouro, por ser exemplo de amor, força e fé, por muitas vezes abrir mão dos seus sonhos para realizar os meus, por todo incentivo, palavras de encorajamento e pelas orações. É uma honra ser motivo de seu orgulho!

À minha irmã, Neyrijane Targino, por seu amor, carinho, cuidado, pela amizade, companheirismo e por me apoiar nos momentos de dificuldades.

Ao meu esposo, Lúcio Pedrosa, por seu amor, amizade e compreensão, pelas palavras de incentivo, por sempre estar ao meu lado torcendo pelas minhas conquistas e comemorando a cada etapa vencida. A minha eterna gratidão por me ajudar a conquistar este sonho.

À minha família, por todo amor, carinho, apoio e dedicação, por sempre torcer pelo meu sucesso.

Ao meu cunhado, Felipe Holmes, pela amizade, orações, conselhos, torcida e incentivo.

À Rayssa Carvalho, irmã-amiga, companheira de todas as horas desde a graduação, obrigada por sua amizade, lealdade e cumplicidade, por seu amor, carinho e pelos momentos compartilhados dentro e fora da UFPB.

Às minhas amigas Adma Melo, Aline Macedo, Carine Maciel, Narciza Arcanjo, Kelianne Lunguinho, Renata Maynart e Taliana Bezerra, pela amizade, apoio, torcida, conselhos e palavras de encorajamento.

Aos meus queridos amigos-irmãos pela amizade, orações, palavras de incentivo, torcida e pelos momentos compartilhados.

Aos colegas que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos LPMA/CT - UFPB, Daniele Schabo, Helena Diniz, Janaína Sousa, Jessica Guedes, Keyth Sulamita, Laênia Lopes, Myrella Cariri, Sonalle Albuquerque, Suênia Moraes, Winnie Alencar e Whyara Costa e aos demais que fazem parte desse grupo científico, pela amizade, cooperação, e pelos bons momentos de convívio. À Maísa Chaves, “minha PIBIC”, pela dedicação, amizade e auxílio ao longo dos experimentos. À Erika Almeida pelo auxílio durante as análises de CF. Em especial ao técnico do LPMA Sr. Gilvandro Costa, por sua amizade, contribuições, disposição e ajuda prestada.

Sendo impossível citar todos os nomes, agradeço a todos que, de alguma forma, cooperaram para realização deste trabalho e torceram pelo meu sucesso.

“Sei que o meu trabalho é uma gota no oceano.

Mas sem ele, o oceano seria menor.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Os óleos essenciais *Citrus lemon* (OECL) e *C. reticulata* (OECR) possuem atividade antimicrobiana frente bactérias deteriorantes de sucos de fruta. Um fator limitante da aplicação destas substâncias como conservantes em sucos é que as concentrações necessárias para o alcance da eficácia antimicrobiana geralmente excedem o limite de aceitação sensorial dos consumidores. O presente estudo objetivou avaliar a aplicação de concentrações sensorialmente aceitas de OECL ou OECR isoladas ou em combinação com tratamento térmico moderado (TTM) frente a bactérias deteriorantes isoladas de sucos de maçã e laranja. Inicialmente, foram determinados os limiares sensoriais de aceitação comprometida (LAC) e de rejeição (LR) do OECL e OECR em sucos de maçã e laranja. As concentrações do OECL e OECR (0,13, 0,25 e 0,50 µL/mL), abaixo do LR, foram avaliadas isoladas e em combinação com TTM (54 °C; 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 min) frente *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* isolados de sucos de maçã ou laranja. Os efeitos da aplicação combinada do OECL ou OECR com TTM nos parâmetros físico-químicos (sólidos solúveis totais, pH e acidez titulável) dos sucos foram avaliados após 12 min de exposição. Posteriormente, a concentração de 0,50 µL/mL de OECL ou OECR isolada ou em combinação com TTM foi avaliada quanto aos efeitos nas funções fisiológicas de *L. brevis* e *L. mesenteroides* em suco de laranja utilizando citometria de fluxo. A concentração inibitória mínima do OECL e OECR frente *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. mesenteroides* foi de 2,0 µL/mL. O LAC do OECL e OECR variou de 0,15 µL/mL a 0,17 µL/mL nos sucos de maçã e laranja. O LR do OECL foi de aproximadamente 0,58 µL/mL nos sucos de maçã e laranja, e o LR do OECR foi de 0,68 µL/mL nos dois sucos testados. Apenas a concentração de 0,50 µL/mL (abaixo do LR) do OECL e OECR quando aplicada isolada foi efetiva para reduzir $\leq 2 \log_{10}$ UFC/mL nas contagens de *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. mesenteroides* após 12 min de exposição. O uso combinado das concentrações de OECL e OECR abaixo do LR e TTM (54 °C) apresentaram efeito sinérgico frente as cepas teste. A inativação nos sucos de maçã e laranja variou entre as cepas teste, concentrações dos OEs, o suco de fruta e tempo de exposição avaliado. Uma redução de aproximadamente 5 $\log_{10}$ UFC/mL foi observada nas contagens de *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. mesenteroides* após 12 min de exposição a 0,50 µL/mL de OECL ou OECR em combinação com TTM nos sucos de maçã e laranja. As concentrações do OECL e OECR efetivas quando aplicadas em combinação com TTM frente as cepas teste não alteraram os parâmetros físico-químicos monitorados nos sucos de maçã e laranja. A extensão do dano nas funções fisiológicas variou entre os OEs, as cepas teste e, dependeu do tempo de exposição no suco de laranja. OECR isolado ou em combinação com TTM causou permeabilização, despolarização e comprometeu a atividade respiratória e de efluxo em uma porcentagem maior nas células de *L. mesenteroides* do que nas células de *L. brevis*, enquanto o oposto foi observado para OECL. A maior porcentagem (até 99%) de células permeabilizadas, despolarizadas e com atividade respiratória e de efluxo comprometida sempre foi observada nos tratamentos combinados, independentemente do tempo de exposição ou da cepa testada. Os resultados obtidos nesse estudo indicam a aplicação de concentrações sensorialmente aceitas de OECL ou OECR em combinação com TTM como uma tecnologia viável para controlar bactérias deteriorantes de sucos de frutas.

Palavras-chave: Calor moderado; citometria de fluxo; limiares sensoriais; óleos essenciais de *Citrus* spp.; sucos de frutas.

ABSTRACT

Citrus lemon (CLEO) and *C. reticulata* essential oils (CREO) have antimicrobial activity against spoilage bacteria of fruit juices. A limiting factor in the application of these substances as preservatives in fruit juices is that the effective concentrations typically exceed the limit of sensory acceptance of consumers. This study assessed the application of sensorially accepted concentrations of CLEO and CREO alone or in combination with mild heat treatment (MHT) against spoilage bacteria isolated from apple and orange juices. Initially, were determined the compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT) of CLEO and CREO in apple and orange juices. The concentrations of CLEO and CREO (0.13, 0.25 e 0.50 $\mu\text{L/mL}$), below the RT, were assessed alone and in combination with MHT (54 °C, 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 min) against *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from apple and orange juices. The effects of the combined application of CLEO and CREO with MHT on the physical-chemical parameters (total soluble solids, pH and titratable acidity) of the juices were assessed after 12 min exposure. The concentration 0.50 $\mu\text{L/mL}$ of CLEO and CREO alone or in combination with MHT was assessed the effects on physiological functions of *L. brevis* and *L. mesenteroides* in orange juice using flow cytometry. The minimal inhibitory concentration of CLEO and CREO against *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. mesenteroides* was 2.0 $\mu\text{L/mL}$. The CAT of CLEO and CREO varied from 0.15 to 0.17 $\mu\text{L/mL}$ in apple and orange juices. The RT of CLEO was approximately 0.58 $\mu\text{L/mL}$ in apple and orange juices, and the RT of CREO was 0.68 $\mu\text{L/mL}$ in both juices. When CLEO and CREO were assayed alone, the highest concentration (0.50 $\mu\text{L/mL}$) decreased counts of all strains approximately 2 $\log_{10}$ CFU/mL after 12 min of exposure. All concentrations of CLEO or CREO below the RT in combination with MHT acted synergistically against *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides*. Decreases in counts varied with the strain, CLEO and CREO concentrations, juice type and exposure time. A reduction of approximately 5 $\log_{10}$ CFU/mL was observed in the counts of *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. mesenteroides* after 12 min of exposure to 0.50 $\mu\text{L/mL}$ CLEO or CREO in combination with MHT in apple and orange juices. Effective combinations of CLEO or CREO with MHT against the test strains did not compromise the quality parameters of apple and orange juices. The extension of damage on physiological functions varied between CLEO and CREO, the tested strains and depended on the exposure time in orange juice. CREO alone or combined with MHT caused permeabilisation, depolarisation and compromised the respiratory and efflux activity in a percentage cells of *L. mesenteroides* than *L. brevis* cells, while the opposite was observed for CLEO. The highest percentage (up to 99%) of cells permeabilised, depolarised and with compromised respiratory and efflux activity were always observed in combined treatments, regardless the time of exposure or strain tested. The results obtained in this study indicate the application fo sensorially accepted concentrations of CLEO and CREO in combination with MHT as feasible technologie in spoilage bacteria control of fruit juices.

Keywords: Mild heat; flow cytometry; sensory thresholds; essential oils of *Citrus* spp.; fruit juices.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figure 1 - Calculated t values (Y1 - axis) and mean hedonic scores (Y2 - axis) in the function of *Citrus lemon* (A, B) or *Citrus reticulata* (C, D) essential oil concentration (X - axis) for apple (A, C) and orange (B, D) juices. The black dashed line represents the tabulated t ($t_{\text{tab}} = 2.01$), and the black circle (●) represents the compromised acceptance threshold. The gray dashed line represents a mean hedonic score of 5 and the gray circle (○) the rejection threshold.....93

Figure 2 - Log₁₀ cycles of inactivation of *Lactobacillus brevis* (A), *Lactobacillus plantarum* (B) and *Leuconostoc mesenteroides* (C) in apple (A1-C1) and orange (A2-C2) juices at room temperature as a function of exposure time and *Citrus lemon* essential oil concentration: (●) control: 0 $\mu\text{L/mL}$; (■) 0.13 $\mu\text{L/mL}$; (▲) 0.25 $\mu\text{L/mL}$; (▼) 0.50 $\mu\text{L/mL}$. Data represent the means $\pm$ standard deviations (error bars) of at least three independent experiments.....95

Figure 3 - Log₁₀ cycles of inactivation of *Lactobacillus brevis* (A), *Lactobacillus plantarum* (B) and *Leuconostoc mesenteroides* (C) in apple juice (A1-C1) and orange juice (A2-C2) at room temperature as a function of exposure time and *Citrus reticulata* essential oil concentration: (●) control: 0 $\mu\text{L/mL}$; (■) 0.13 $\mu\text{L/mL}$; (▲) 0.25 $\mu\text{L/mL}$; and (▼) 0.50 $\mu\text{L/mL}$. Data represent the means $\pm$ standard deviations (error bars) of at least three independent experiments.....97

Figure 4 - Survival fraction of *Lactobacillus brevis* after treatment: (●) heated at 54 °C; (■) *Citrus lemon* (A, B) or *Citrus reticulata* (C, D) essential oil applied at 0.50 $\mu\text{L/mL}$; and (▲) combined treatment (heat treatment (54 °C) in the presence of the EO (0.50 $\mu\text{L/mL}$) in apple (A, C) and orange (B, D) juices. The figure includes the theoretical inactivation curves obtained by considering the lethality caused by the heat and the EO treatment acting separately (additive effect) (□) and the fitting of Equation 1 to the survival curves obtained after the combined treatments. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean (error bars) of at least three independent experiments.....99

Figure 5 - Relationship between the EO concentration and the log of 3δ values of *Lactobacillus brevis* (●), *Lactobacillus plantarum* (■) and *Leuconostoc mesenteroides* (▲) in apple (A, C) and orange (B, D) juices and heat treated at 54 °C in the presence of *Citrus lemon* (A, B) and *Citrus reticulata* (C, D) essential oils.....101

ARTIGO 2

Figure 1 - Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining with TO and PI after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 µL/mL) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 µL/mL) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M and S). The vertical axis indicates the fluorescence intensity of the TO; the horizontal axis indicates the fluorescence intensity of the PI. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.....124

Figure 2 - Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining with BOX and PI after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 µL/mL) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 µL/mL) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M and S). The vertical axis indicates the fluorescence intensity of the BOX; the horizontal axis indicates the fluorescence intensity of the PI. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.....126

Figure 3 - Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining a CTC after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 µL/mL) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 µL/mL) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M

and S). The horizontal axis indicates the fluorescence intensity of CTC-formazan; the vertical axis indicates the side-light scatter intensity. The respiratory active cell subpopulation was gated in the right rectangles; the inactive cell subpopulation was gated in the rectangles. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.....128

Figure 4 - Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining a EB after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 µL/mL) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 µL/mL) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M and S). The horizontal axis indicates the fluorescence intensity of EB; the vertical axis indicates the side-light scatter intensity. The negative stain subpopulation was gated in the left rectangles; the positive stain subpopulation was gated in the right rectangles. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.....130

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Constituents identified by CG-MS in the essential oil from <i>Citrus lemon</i> (CLEO) and <i>Citrus reticulata</i> (CREO)	89
Table 2 - Adjusted models of compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT) determination of <i>Citrus lemon</i> (CLEO) or <i>Citrus reticulata</i> (CREO) essential oil in apple and orange juices and their respective coefficients of determination.....	90
Table 3 - p and δ values estimated from the fitting of Equation 1 to experimental data in assays with <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Leuconostoc mesenteroides</i> in apple and orange juices treated with MHT (54 °C for 12 min) and essential oils from <i>Citrus lemon</i> (CLEO) and <i>Citrus reticulata</i> (CREO).....	91
Table 4 - Physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation; n = 6) of apple and orange juices treated with <i>Citrus lemon</i> (CLEO) or <i>Citrus reticulata</i> (CREO) essential oil and MHT (54 °C; 12 min).....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Acidez titulável
BAL	Bactérias ácido lácticas
BOX	Ácido bis-1,3-dibutilbarbutírico
CIM	Concentração inibitória mínima
CF	Citometria de fluxo
CTC	5-ciano-2,3-ditolil tetrazólio
DO	Densidade óptica
FSC	Luz de dispersão frontal
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HSCS	Pontuação hedônica da amostra de controle
HSSS	Pontuação hedônica da amostra de estímulo
IR	Índice de retenção
LAC	Limiar de aceitação comprometida
LR	Limiar de rejeição
MRS	De Man, Rogosa e Sharpe
OECL	Óleo essencial <i>Citrus lemon</i>
OECR	Óleo essencial <i>Citrus reticulata</i>
OEs	Óleos essenciais
PI	Iodeto de propídio
SSC	Luz de dispersão lateral
SST	Sólidos solúveis totais
TO	Laranja de tiazol
TTM	Tratamento térmico moderado
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 SUCOS DE FRUTAS.....	22
3.1.1 Bactérias ácido lácticas deteriorantes de sucos de frutas.....	24
3.2 CONSERVAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS.....	25
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS.....	28
3.3.1 Aplicação combinada de OE com TTM na conservação de sucos de frutas.....	30
3.4 CITOMETRIA DE FLUXO NA MICROBIOLOGIA.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES.....	35
4.2 PREPARAÇÃO DOS SUCOS E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	35
4.2.1 Identificação de isolados de bactérias ácido lácticas utilizando 16S rRNA Gene Sequence.....	36
4.3 CEPAS TESTE.....	37
4.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	37
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OECL E OECR.....	38
4.6 DETERMINAÇÃO DOS LIMIARES DE ACEITAÇÃO COMPROMETIDA (LAC) E REJEIÇÃO (LR) DE OECL E OECR EM SUCOS DE FRUTAS.....	39
4.7 AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE CEPAS TESTE POR OECL E OECR EM SUCOS DE FRUTAS.....	40
4.8 AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE CEPAS TESTE POR OECL OU OECR EM COMBINAÇÃO COM TTM EM SUCOS DE FRUTAS.....	41
4.9 MODELAGEM DAS CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE CEPAS TESTE EM SUCOS TRATADOS COM OECL OU OECR EM COMBINAÇÃO COM TTM.....	42
4.10 EFEITO DO OECL OU OECR EM COMBINAÇÃO COM TTM SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS SUCOS DE FRUTAS.....	42

4.11 EFEITO DO OECL, OECR OU TTM E DO TRATAMENTO COMBINADO SOBRE AS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS CEPAS TESTE.....	43
4.12 PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO.....	44
4.12.1 Integridade da membrana.....	44
4.12.2 Potencial da membrana.....	44
4.12.3 Atividade respiratória.....	44
4.12.4 Atividade de efluxo.....	45
4.13 ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO (CF).....	45
4.14 ANÁLISE DOS DADOS DA CF.....	45
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 ARTIGO 1: Control of autochthonous spoilage lactic acid bacteria in apple and orange juices by sensorially accepted doses of <i>Citrus</i> spp. essential oils combined with mild heat treatments.....	60
5.2 ARTIGO 2: Effects of <i>Citrus lemon</i> and <i>C. reticulata</i> essential oils in combination with mild heat treatment on physiological functions of autochthonous spoilage bacteria in orange juice.....	103
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
APÊNDICES.....	133
APÊNDICE A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética de Pesquisa.....	133
APÊNDICE B – Formulário para Análise Sensorial	138

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores polos mundiais de produção de sucos de frutas, segmento que se encontra em plena expansão (FACCHINETTI, 2018). O suco de laranja é o mais consumido e exportado do país, sendo que 98% da produção nacional de laranja (*Citrus sinensis*) é destinada à produção de suco para o mercado interno e externo (CITRUSBR, 2018). Ainda, no mercado de sucos de frutas, destaca-se o suco de maçã, no Brasil cerca de 25% da produção de maçã (*Pyrus malus*) é destinada à produção de sucos para o mercado externo devido ao seu elevado consumo mundial, particularmente na Europa e nos Estados Unidos da América - EUA (IBGE, 2018).

Os sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo devido às suas características de sabor, frescor, além de ser um alimento saudável e fonte natural de carboidratos, vitaminas e minerais (WŁODARSKA et al., 2016; PARAVISINI; PETERSON, 2019). No entanto, devido as condições encontradas durante a produção como o contato com o ar, micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos presentes no ambiente ou como parte da microbiota autóctone, os sucos de frutas frescas são amplamente suscetíveis à deterioração (ESPINA et al., 2013).

A deterioração microbiana dos sucos de frutas ocorre principalmente por meio de micro-organismos tolerantes ao meio ácido como, por exemplo, as bactérias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp. (DI CAGNO et al., 2011). Estas bactérias são produtoras de CO₂, ácido láctico, acético e fórmico e, por isso, podem conferir forte odor e sabor desagradável ao suco (GUERROUJA et al., 2016). BAL deteriorantes geralmente são inativadas quando submetidas ao tratamento térmico (SNYDER; WOROBO, 2018).

A pasteurização é o método de conservação mais utilizado em sucos de frutas e consiste em submeter os sucos a elevadas temperaturas (72 a 82 °C) por um pequeno intervalo de tempo (0,3 a 15 s). Esse processo causa alterações nas propriedades físico-químicas, nutricionais e sensoriais do produto (PETRUZZI et al., 2017; CARRILLO; FERRARIO; GUERRERO, 2018). Os sucos de frutas também são geralmente conservados pela adição de aditivos alimentares, como o ácido sórbico, ácido benzoico e dióxido de enxofre, entretanto seu uso pode prejudicar à saúde dos consumidores (FUJIYOSHIA et al., 2018).

Uma alternativa para reduzir as alterações indesejáveis causadas pelas altas temperaturas utilizadas nos métodos tradicionais de conservação é o tratamento térmico moderado (TTM), que consiste em submeter o alimento em uma faixa de temperatura entre 40-60 °C. Porém, por provocar apenas injúrias subletais nos micro-organismos presentes no

alimento, o TTM deve ser aplicado em combinação com outros métodos de conservação de alimentos para garantir a estabilidade do produto, as características físico-químicas, nutricionais e sensoriais, bem como, a segurança microbiológica (AIT-OUAZZOU et al., 2013).

O uso de compostos antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais (OEs), em sucos de frutas de forma isolada ou combinada com outros métodos de conservação, tem sido reconhecido como eficaz (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES et al., 2016). OEs possuem atividade antimicrobiana contra bactérias deteriorantes e/ou patogênicas de origem alimentar (SEOW et al., 2014). Dentre os OEs que apresentam potencialidade antimicrobiana, destacam-se àqueles obtidos das espécies cítricas, *Citrus lemon* (OECL; limão) e *C. reticulata* (OECR; tangerina) (ESPINA et al., 2014) que são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) para utilização em alimentos e bebidas (Código dos Regulamentos Federais 8008-56-8 para OECL e 8016-85-1 para OECR). Contudo, as concentrações dos OEs requeridas para atingir a eficácia antimicrobiana podem alterar o sabor original do produto e exceder o limite de aceitabilidade sensorial dos consumidores (SOUSA GUEDES et al., 2016). Entretanto, a determinação dos limites sensoriais dos OEs não tem sido reportada pelos estudos que avaliam os efeitos dos OEs como método de conservação de sucos de frutas.

O uso combinado de OEs com TTM tem sido sugerido como uma estratégia promissora para a incorporação de OEs em sucos pois a sua aplicação pode resultar em efeitos sinérgicos e/ou aditivos e permitir a redução da intensidade de cada método de conservação, resultando na manutenção das propriedades de qualidade desses produtos (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES et al., 2016). Entretanto, os efeitos dos OECL ou OECR aplicados isolados ou combinados com TTM sobre as funções fisiológicas de bactérias autóctones de deterioração de sucos de maçã e laranja ainda são desconhecidos.

É crescente a busca por métodos que avalie as funções fisiológicas das células bacterianas, isto porque os métodos tradicionais de cultivo apenas quantificam as células viáveis (MACHETA et al., 2013; CIEMNIAK et al., 2018). Assim, o uso de citometria de fluxo (CF) acoplada a corantes fluorescentes específicos permite detecção rápida e confiável do estado fisiológico microbiano e evidencia possíveis alterações na integridade da membrana, potencial de membrana, atividade respiratória, atividade de efluxo, atividade metabólica e atividade enzimática, entre outros, após exposição a um ou mais tratamentos antimicrobianos ou processos de inativação (FERRARIO; GUERRERO, 2017; ZHANG et al., 2018).

Considerando-se estes aspectos, objetivou-se avaliar os efeitos da aplicação de concentrações sensorialmente aceitas de OECL e OECR aplicados isolados ou em combinação

com TTM na inativação e nas funções fisiológicas das células de BAL deteriorantes isoladas da microbiota autóctone de sucos de maçã e laranja. O conhecimento da eficácia do uso combinado dos OEs com TTM na conservação de sucos surge, portanto, como uma alternativa promissora no alcance de produtos com qualidade microbiológica, sensorial e nutricional que possam atender a demanda dos consumidores por alimentos seguros, porém sem alteração das características de qualidade do produto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos óleos essenciais de *Citrus lemon* (OECL; limão) e *Citrus reticulata* (OECR; tangerina) isolados ou combinados com tratamento térmico moderado (TTM) frente bactérias ácido lácticas (BAL) deteriorantes em sucos de maçã (*Pyrus malus*) e laranja (*Citrus sinensis*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os constituintes voláteis dos OEs de *Citrus lemon* (OECL) e *Citrus reticulata* (OECR);
- Isolar e identificar BAL deteriorantes a partir da microbiota autóctone de sucos frescos de maçã (*Pyrus malus*) e laranja (*Citrus sinensis*);
- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) do OECL e OECR frente BAL selecionadas como cepas teste;
- Determinar os limiares de aceitação comprometida (LAC) e de rejeição (LR) do OECL e OECR em sucos de maçã e laranja com base na CIM determinada frente BAL selecionadas;
- Avaliar os efeitos do OECL e OECR isolados ou combinados com TTM frente as cepas teste de BAL em sucos de maçã e laranja;
- Verificar a influência dos tratamentos efetivos no controle de BAL deteriorantes testadas sobre os parâmetros físico-químicos de sucos de maçã e laranja;
- Investigar os efeitos do OECL e OECR isolados ou combinados com TTM nas funções fisiológicas das cepas teste de BAL em suco de laranja.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SUCOS DE FRUTAS

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de sucos de frutas, sendo que esta produção representa um importante segmento do agronegócio no país (MAPA, 2018). A tendência atual e a manutenção de uma dieta à base de frutas têm contribuído para o aumento do consumo de sucos de frutas (PETRUZZI et al., 2017). O impacto desta demanda nos países em desenvolvimento tem promovido melhoria na capacidade de produção e processamento, assegurando, dessa maneira, a oferta desses produtos no mercado mundial (WŁODARSKA et al., 2016).

O mercado de sucos de frutas tem apresentado um crescimento gradativo de consumo em razão dos seguintes fatores: maior praticidade e diversificação na oferta de produtos com melhor aroma, cor e sabor; o apelo saudável dos sucos de frutas, uma vez que, além do seu valor nutritivo (compostos antioxidantes, vitaminas e minerais), apresenta propriedades funcionais e com poucos teores ou nenhum aditivo sintético (CHUECA et al., 2015; SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016; PRADO et al., 2019). Assim, os sucos prontos para o consumo devem apresentar conveniência e qualidade nutricional, sem perder as características sensoriais (SINGH et al., 2015).

Os sucos de frutas são bebidas não fermentadas obtidas da polpa de frutas polposas, frescas, sãs e maduras, de cor, aroma e sabor característico da fruta, submetidos a processo tecnológico adequado e aos tratamentos de conservação que assegurem sua qualidade sensorial, nutricional e microbiológica até o momento do consumo (BRASIL, 2009). Dentre os sucos de frutas mais produzidos, consumidos e exportados do Brasil destaca-se o suco de laranja. No ano de 2013 a exportação brasileira de suco de laranja ultrapassou 1.000.000 toneladas (CITRUSBR, 2014), e teve no ano de 2016, em relação ao ano de 2015, um acréscimo de 9,79% no consumo de sucos (CITRUSBR, 2017), e no ano de 2017 exportou mais de 1 milhão e 400 mil toneladas (CITRUSBR, 2018). Além disso, o país detém 50% da produção mundial deste suco e exporta 98% do que produz conseguindo atingir 85% de participação no mercado mundial (CITRUSBR, 2018).

O suco de laranja é um produto complexo, formado por uma “mistura” de vários componentes voláteis, responsáveis por seu sabor e aroma, além de ácidos, minerais, vitaminas, pigmentos e açúcares (AGCAM; AKYILDIZ; EVRENDILEK, 2016). Trata-se de uma bebida não diluída, não fermentada, obtida da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis*), através de processo tecnológico adequado, podendo ser adicionada de açúcar na quantidade máxima de

10% (gramas de açúcar por cem gramas de suco) (BRASIL, 2009). O Padrão de Identidade e Qualidade do suco de laranja definido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece a concentração mínima de sólidos solúveis em 10 °Brix, acidez titulável de 7%, ácido ascórbico de 25% e máximo de 13% de açúcares totais (BRASIL, 2018).

O suco de maçã também tem apresentado destaque no comércio mundial devido ao elevado consumo, particularmente na Europa e nos EUA (IBGE, 2018). No Brasil, a produção do suco de maçã (*Pyrus malus*) apresenta-se como uma das formas de preservação da fruta, uma vez que a maçã está entre as principais frutas produzidas pelo país. Em 2018, o principal Estado produtor de maçã foi Santa Catarina, que chegou a produzir 50,9%, totalizando 1,25 milhões de toneladas. Do total de maçãs produzidos nacionalmente, 25% é destinado para o mercado externo, sendo a maior parte em forma de sucos de maçã e uma menor parcela em forma de maçãs frescas (IBGE, 2018).

Para a elaboração dos sucos, as melhores maçãs são aquelas que possuem teores elevados de açúcares e de ácidos (BONDONNO et al., 2017). As maçãs, assim como seu suco, são ricas em compostos fenólicos que incluem ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, que podem prevenir doenças cardiovasculares (BONDONNO et al., 2017), e flavonóides, dihidrochalcona, epicatequina, catequina e flavanóides oligoméricos (KALINOWSKA et al., 2014), além de compostos antioxidantes, cujo consumo favorece a manutenção da saúde como a prevenção de certo tipos de doenças, por exemplo, o câncer de cólon e de pulmão (BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005).

De modo geral, as propriedades físico-químicas da maçã e consequentemente do suco derivado, variam de acordo com fatores naturais (solo, clima, região do plantio), fatores agrônômicos de produção da fruta (cultivares, épocas de colheita, tratamentos culturais, adubações e etc.) e da tecnologia de processamento (EISELE; DRAKE, 2005). No Brasil, os parâmetros físico-químicos para o suco de maçã são estabelecidos pela Instrução Normativa nº 19, que preconiza quantidade mínima de sólidos solúveis de 10,5 °Brix, acidez titulável de 0,15%, máximo de 13,5% de açúcares totais e 0,04% de acidez volátil em ácido acético (BRASIL, 2018).

Sucos de frutas são alimentos altamente suscetíveis a deterioração, e a contaminação microbiana pode ocorrer através dos micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos normalmente encontrados nas frutas, durante a colheita, pós-colheita, devido a manipulação inadequada e condições de armazenamento, aumentando assim as possibilidades de mudanças nas suas características adequadas e os riscos para os consumidores (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016). Os principais micro-organismos encontrados em frutas e produtos

derivados são as leveduras e bactérias ácido lácticas (BAL) (ALMEIDA et al., 2019) BAL deteriorantes comumente encontradas em sucos de frutas incluem espécies de *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp. (DI CAGNO et al., 2011).

3.1.1 Bactérias ácido lácticas deteriorantes de sucos de frutas

BAL formam um grupo de micro-organismos com características metabólicas, fisiológicas e morfológicas comuns. A definição comumente encontrada descreve este grupo como, bactéria Gram-positiva, bastonetes ou cocos não esporulados, anaeróbios facultativos, catalase negativa, desprovida de citocromos, aerotolerantes, fastidiosas, ácido tolerantes e com metabolismo estritamente fermentativo (TODOROV; FRANCO, 2010; PFEILER; KLAENHAMMER, 2007). BAL predominam a microbiota de alimentos ricos em proteínas, carboidratos e vitaminas, particularmente, vegetais, leite, queijo e carne (LÓPEZ-DÍAZ, 2000).

Diversos metabólitos, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas, são produzidos pelas BAL, e podem atuar impedindo o crescimento de outros micro-organismos (GHANBARI et al., 2013; MALDONADO-BARRAGAN et al., 2013). BAL estão presentes na microbiota autóctone que coloniza e adere à superfície das frutas. Para sobreviver nestes ambientes, essas bactérias precisam exercer atividade antagônica frente a inúmeros micro-organismos deterioradores e patogênicos. Assim, a adaptação natural de BAL nas frutas pode influenciar positivamente a sua sobrevivência nos sucos de frutas (VITALI et al., 2012).

Os níveis totais de contaminação microbiana em sucos de frutas, geralmente, variam de 3 a 5 log₁₀ UFC/mL e está associada à presença de BAL (TOURNAS; HEERESB; BURGESSB, 2006; TYAGI et al., 2014). As BAL promovem, nos sucos de frutas, uma rápida acidificação do meio devido ao aumento do ácido láctico, produz o CO₂ e derivados de diacetila que induzem um forte aroma e sabor desagradável de ligeira fermentação. Além disso, podem produzir etanol, ácido acético e fórmico (JAY; ANDERSON, 2001), onde alguns destes ácidos atuam como indicadores de deterioração dos sucos de frutas. Ainda, as BAL são capazes de secretar exopolissacarídeos resultando na formação de biofilmes e aumentando os riscos de pós-contaminação e deterioração, sendo geralmente destruídas quando submetidas ao tratamento térmico (LEROY; VUYST, 2004).

Embora a presença de BAL é mais comumente relatada em sucos de frutas não pasteurizados, a recontaminação após o processamento térmico desempenha um papel importante. Atualmente, as BAL representam um dos desafios mais importantes para o

saneamento das indústrias de frutas e bebidas. Ocorrências de deterioração, em que estes micro-organismos estão envolvidos, são o resultado de falhas em programas de sanitização e limpeza, principalmente a partir do equipamento que vem após a pasteurização na linha de produção (por exemplo, máquinas de enchimento, devido à complexidade da limpeza e desinfecção de respectivas válvulas de enchimento) (JAY; ANDERSON, 2001).

As medidas mais importantes utilizadas para controlar BAL em instalações de sucos de fruta são, respectivamente, a pasteurização, a aplicação de higienizadores na lavagem de frutas e um sistema de sanitização eficiente (LEROY; VUYST, 2004). Entretanto, estudos apontam que os métodos de processamento e conservação dos alimentos tradicionais podem não ser eficazes para controlar ou eliminar bactérias deteriorantes e/ou patogênicas, além de modificar as propriedades físico-químicas e sensoriais dos produtos, fazendo-se necessário desenvolver métodos para controlá-las (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016) e que mantenha as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos.

3.2 CONSERVAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS

O processo de conservação de alimentos baseia-se na manutenção de uma alta qualidade nutricional atrelada a uma longa vida de prateleira. A qualidade dos alimentos pode ser adversamente afetada por alterações ocasionadas pela ação de fatores físicos, químicos ou microbiológicos (SOUZA et al., 2007). Entretanto, o fator microbiológico é o mais importante pela sua capacidade de contaminação, variedade de efeitos que origina e intensidade de alterações que provoca. A contaminação microbiana dos alimentos se destaca pela relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, devido ao risco de causar doenças transmitidas por alimentos contaminados como micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos (SOUZA et al., 2007; FERREIRA, 2017).

Durante o processamento de alimentos, com a finalidade de preservar as características nutricionais e sensoriais dos produtos, e principalmente de minimizar o crescimento de micro-organismos, é comum a utilização de tratamentos físicos e químicos que promovam condições ambientais desfavoráveis para o crescimento microbiano (GOMES-NETO et al., 2014; SHAH et al., 2013). A conservação de sucos de frutas segundo a legislação específica RDC nº 12 é determinada inicialmente pela inibição da ação de enzimas naturais e pela prevenção do desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes (BRASIL, 2000). Estes objetivos são classicamente alcançados por meio do uso de tratamentos térmicos e/ou de aditivos alimentares (LIMA et al., 2012).

Na indústria de alimentos, a pasteurização é o tratamento térmico mais empregado na conservação de sucos de frutas e consiste em submeter os sucos a uma determinada temperatura e intervalo de tempo (PETRUZZI et al., 2017). A pasteurização é realizada por meio de trocas térmicas do suco com vapor aquecido em trocadores de calor, onde o vapor transfere calor latente para o suco aumentando assim sua temperatura. Após o aquecimento, o suco também passa por um resfriamento dentro do mesmo equipamento. Esse resfriamento é feito através de contato indireto do suco que está saindo do pasteurizador com o suco que está entrando, provocando, assim, uma redução na temperatura do produto de saída (VEGARA et al., 2013).

A aplicação da pasteurização reduz a carga microbiana de sucos de frutas e inativa complexos enzimáticos existentes (GÓMEZ; WELTI-CHANES; ALZAMORA, 2011), como a enzima pectinesterase que, em sucos cítricos, pode afetar a turbidez natural do suco. Entretanto, a alta temperatura utilizada para aumentar a vida de prateleira e a segurança microbiológica, destes produtos, pode provocar alterações indesejáveis nas propriedades sensoriais (CARRILLO; FERRARIO; GUERRERO, 2018). Além disso, elevadas temperaturas podem causar a degradação dos carotenoides que são responsáveis pela pigmentação do suco afetando a cor do produto (HASHIMOTO; URAGAMI; COGDELL, 2016) e provocar perdas nutricionais, por exemplo, a vitamina C, encontrada em abundância em sucos de frutas cítricas que uma vez dissolvida no suco se torna sensível a temperatura (PETRUZZI et al., 2017; CARRILLO; FERRARIO; GUERRERO, 2018).

O uso de aditivos alimentares também tem sido uma prática recorrente em sucos de frutas para retardar ou impedir alterações enzimáticas decorrentes do metabolismo microbiano (VALLY; MISSO; MADAN, 2009). Os efeitos antimicrobianos dos conservantes sintéticos podem ocorrer em um ou mais componentes e/ou atividades celulares, tais como, modificações na membrana plasmática, síntese proteica, DNA, parede celular, transporte de nutrientes e atividade enzimática (RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2009). Dentre os aditivos alimentares mais utilizados, destaca-se, o ácido sórbico (INS 200), ácido benzoico (INS 210) e dióxido de enxofre (INS 220) (VALLY; MISSO; MADAN, 2009).

O ácido sórbico (INS 200) e benzoico (INS 210) são os ácidos orgânicos mais utilizados e de maior atividade antimicrobiana, seu efeito depende das concentrações de íons H^+ e dos ácidos não dissociados, que em sua maioria são hidrofóbicos, o que facilita sua penetração através das membranas plasmáticas (FUJIYOSHIA et al., 2018). Assim, no interior da célula, a molécula se dissocia em pH alto, liberando ânions e prótons que não podem penetrar e voltar para a membrana, ficando preso dentro da célula. Portanto, a ação antimicrobiana dos ácidos

sórbico e benzoico é favorecida por valores de pH baixos devido ao estado não dissociado da molécula (AMIRPOUR et al., 2015).

O ácido sórbico (INS 200) é eficiente no controle de bactérias, fungos e leveduras. Tecnicamente, este aditivo atua nas células bacterianas em diversas regiões, como por exemplo, nas enzimas, no metabolismo dos carboidratos e do ciclo dos citratos. A maior eficiência do ácido sórbico ocorre em pH ácido embora sua faixa de atuação se estenda até o pH 6,0. Em sucos, a quantidade máxima permitida é de 1.000 ppm (AUN et al., 2011).

O ácido benzoico (INS 210) trata-se de um bactericida e fungicida, porém, quando se busca a conservação por períodos mais longos, este conservante é utilizado combinado com outros aditivos alimentares, pois sua ação sobre os micro-organismos não ultrapassa 45 dias (FUJIYOSHIA et al., 2018). Possui maior eficiência em valores de pH entre 2,5 e 4,0, entretanto, em valores de pH >4,5 sua eficiência é comprometida. Assim, quanto mais baixo o valor do pH, menor será a concentração de ácido benzoico necessária para à ação conservante. A quantidade máxima permitida para os sucos e polpas de frutas é de 1.000 ppm (WILSON; BAHNA, 2005).

O dióxido de enxofre (INS 220) trata-se de um conservante sintético utilizado no controle de bactérias, fungos e leveduras, escurecimento enzimático e não enzimático e da preservação do aroma, frescor e sabores das frutas. Sua atuação sobre os micro-organismos ocorre em pH 4,5. Uma vez que ainda serão diluídos para a formação da bebida, a legislação limita o seu uso nos sucos e polpas de frutas em 200 ppm, pois valores acima de 200 ppm pode desenvolver odores desagradáveis no produto final. Além disso, por possuir efeitos destrutivos sobre a vitamina B1 (tiamina), o seu uso é proibido em alimentos considerados fontes desta vitamina (TONIOLO et al., 2010).

Assim, com a finalidade de reduzir as alterações físico-químicas, nutricionais e sensoriais indesejáveis causadas pelas altas temperaturas utilizadas na pasteurização e pela adição de aditivos alimentares (SHAH et al., 2013) na conservação de sucos de frutas, atrelado à crescente demanda por partes dos consumidores por alimentos frescos, livres ou com redução nos níveis de aditivos alimentares (FANCELLO et al., 2016), têm sido sugerido e reconhecido como eficaz a utilização isolada ou combinada de compostos antimicrobianos naturais, tais como, os óleos essenciais (OEs) com outros métodos de conservação (CALO et al., 2015).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS

Os OEs são compostos voláteis extraídos de plantas, caracterizados por forte odor, líquidos, solúveis em solventes orgânicos e lipossolúveis. São constituídos por metabólitos secundários de plantas aromáticas, podendo ser sintetizados a partir de diversas regiões da planta, como por exemplo, nos frutos, brotos, galhos, flores, folhas, cascas, madeiras e raízes, e são armazenados em cavidades ou células epidérmicas e secretoras (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Constituídos de uma mistura complexa de diversos compostos orgânicos de baixo peso molecular, os OEs podem conter cerca de 20 a 80 componentes em concentrações e atividades antimicrobianas diferentes (AIT-OUAZZOU et al., 2011). Os OEs são constituídos principalmente por aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres, éteres, hidrocarbonetos, monoterpenos, fenilpropanóides, que em sua maioria são voláteis (MARQUES et al., 2015). São compostos lipofílicos e sua densidade é menor que a da água (TOHIDI; RAHIMMALEK; ARZANI, 2017). De acordo com a sua estrutura química esses compostos podem ser divididos em quatro grupos, tais como, terpenos, terpenóides, fenilpropenos e outros (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

A International Organization for Standardization 9235 2013 (IOS) define OE como “um produto obtido por destilação em água ou vapor, por destilação seca de materiais naturais ou por extração de pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae)”. Além da técnica de destilação, outros métodos de extração são utilizados, tais como, destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, microextração em fase sólida, extração por micro-ondas, extração com solvente orgânico, extração por fluídos supercríticos e enfloração. A escolha de cada técnica vai depender do material disponível, variando, assim, a pureza do produto final (SIMÕES et al., 2007).

A atividade antimicrobiana dos OEs pode ser influenciada por vários fatores, tais como, composição, concentração, processamento e estocagem, sua composição química pode variar conforme a espécie vegetal, origem, parte da planta, clima, época de colheita, região, estação do ano e condições climáticas (AL-JABRI; HOSSAIN, 2018). O potencial antimicrobiano dos OEs tem sido atribuído aos componentes presentes de maior quantidade que podem atuar de maneira isolada, como também em associação com os constituintes de menor quantidade podendo exercer efeito sinérgico, aditivo e/ou antagônico, resultando em maior ou menor atividade biológica (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012).

A sobrevivência ou inibição do crescimento dos micro-organismos podem ocorrer devido as suas características hidrofóbicas que possibilita a passagem dos OEs pela parede

celular provocando perda de integridade, ruptura e desestabilização da membrana citoplasmática, e consequentemente vazamento de material celular como íons, ATP e ácido nucléico (TAO; JIA; ZHOU, 2014). Além disso, a ação dos OEs pode provocar inativação do mecanismo enzimático, modificações no transporte de elétrons e na composição e função da membrana, provocando vazamento de material citoplasmático, sensibilização da dupla camada fosfolipídica, lise e eventual morte da célula (BAZARGANI; ROHLOFF, 2016; BASSANETTI et al., 2017).

Os OEs e seus constituintes caracterizam-se como produtos naturais, Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS), e têm sido aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em alimentos e bebidas (SOUSA et al., 2012). Estudos tem reportado a atividade de OEs e seus constituintes em ensaios com matrizes alimentares como sucos (BASAK, 2018; ALMEIDA et al., 2019); frutas e derivados (ROLLER; SEEDHAR, 2002); queijo (KHORSHIDIAN et al., 2018); frango e carne (BAZARGANI-GILANI; ALIAKBARLU; TAJIK, 2015); presunto (MENEZES et al., 2018); ovos (MOUSAVI et al., 2017); arroz (SONGSAMOE; MATANAN; MATAN, 2017) e chocolate (FAYAZ et al., 2017).

Dentre os diversos OEs que apresentam potencialidade antimicrobiana, destacam-se àqueles obtidos das espécies cítricas, *Citrus lemon* (OECL) e *Citrus reticulata* (OECR) (ESPINA et al., 2014), que são compostos por uma mistura complexa (NANNAPANENI et al., 2009), sendo eles voláteis (85 a 99%) e não-voláteis (1 a 15%) (FISHER; PHILLIPS, 2008). Os constituintes voláteis são uma mistura de monoterpenos (tais como limoneno) e hidrocarbonetos sesquiterpeno e seus derivados oxigenados, incluindo aldeídos (tais como citral), cetonas, ácidos, álcoois (tais como linalol) e ésteres (FLAMINI; TEBANO; CIONI, 2007).

Os OEs do gênero *Citrus* estão entre os mais utilizados no mundo e o Brasil destaca-se na produção destes OEs a partir de subprodutos da indústria de sucos. O limoneno, que é um monoterpeno alifático amplamente distribuído em diversos OEs, tem sido frequentemente relatado como constituinte majoritário dos OEs obtidos de *Citrus* spp. (TADTONG; WATTHANACHAIYINGCHAROEN; RUANGRUNGSI, 2015). A concentração de limoneno em OEs de *Citrus* spp. pode representar até 98% da composição total, no entanto, pode haver diferenças tanto em seu teor, quanto dos demais constituintes químicos que se apresentam em pequenas quantidades ou traços (<1%) (SVOBODA; GREENAWAY, 2003). Os monoterpenos do limoneno mais abundantes são os dois enantiômeros. O R-(+)-limoneno é o constituinte majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja, enquanto o S-(-)-limoneno (FOUAD; CAMARA, 2017) é principalmente encontrado numa variedade de plantas e ervas como

Mentha spp. (DEMYTTENAERE; VANOVERSCHELDE; DE KIMPE, 2004). Apesar da sua semelhança geral, estas duas substâncias podem exibir diferenças na atividade biológica (GIATROPOULOS et al., 2012).

Fisher e Phillips (2008) propuseram a adição dos OEs de *Citrus* spp. em vegetais, frango, peixe, carne, produtos lácteos e produtos de confeitaria. Estudos anteriores reportaram que o OECL exibe forte atividade antimicrobiana contra alguns micro-organismos contaminantes de alimentos, incluindo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium digitatum* (TAO; JIA; ZHOU, 2014; HUANG et al., 2012). Além disso, os OECL e OECL são frequentemente citados como promissores para conservar sucos de frutas (ESPINA et al., 2014). A atividade antimicrobiana dos OEs em alimentos vegetais, tais como sucos de frutas, pode ser favorecida pelo baixo valor de pH e pela baixa disponibilidade de lipídios, pois elevados teores de gordura dificultam a interação dos constituintes dos OEs com as células bacterianas (BURT, 2004).

Nos alimentos, a concentração de OE necessária para obter a inativação microbiana pode provocar alterações nas características físico-químicas, nutricionais e sensoriais e, consequentemente, atingir a rejeição sensorial pelos consumidores (ALMEIDA et al., 2018). Assim, o uso combinado de OEs com outras tecnologias de conservação de alimentos, tais como, tratamento térmico moderado (TTM), filtração de membrana, campo elétrico pulsado, desidratação osmótica, ultra-som, irradiação, alta pressão hidrostática, embalagem ativa e tratamento com ozônio (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016), podem resultar em efeitos sinérgicos e/ou aditivos e permitir a redução da intensidade de cada método de conservação utilizada, resultando na manutenção das características de qualidade do produto.

3.3.1 Aplicação combinada de OE com TTM na conservação de sucos de frutas

As características de qualidade físico-químicas e sensoriais, bem como a estabilidade e a segurança microbiológica dos alimentos podem ser adquiridas pelo uso combinado de métodos de conservação. A tecnologia dos métodos combinados ou teoria dos obstáculos baseia-se na aplicação simultânea de diversos fatores de preservação e, consequentemente, no efeito sinérgico pois a inativação microbiana obtida supera a soma dos efeitos alcançados quando os métodos de conservação são aplicados isolados e de formas drásticas (BEVILACQUA et al., 2013; LEISTNER, 1992).

As interações sinérgicas resultantes da combinação de métodos de conservação emergentes e a aplicação de compostos antimicrobianos naturais tem sido sugerido com

possíveis estratégias para a substituição dos métodos tradicionais de pasteurização e aditivos alimentares que provocam alterações indesejáveis na qualidade final do produto. Assim, com o uso combinado de tecnologias emergentes, espera-se obter mínimas alterações sensoriais e nutricionais além de aumentar a vida de prateleira dos produtos (AIT-OUAZZOU et al., 2013). Dentre estas tecnologias, destacam-se aplicação de antimicrobianos naturais, como os OEs de plantas e o TTM na conservação dos alimentos (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016).

O TTM consiste em submeter o alimento em uma faixa de temperatura entre 40-60 °C, porém, sua aplicação, na maioria das vezes, provoca apenas injúrias subletais, ou seja, destrói uma parte e não todos os micro-organismos presentes no alimento. Assim, este método de conservação deve ser aplicado em combinação com outras tecnologias de conservação de alimentos para obter produtos seguros e que preservem os aspectos nutricionais e sensoriais (AIT-OUAZZOU et al., 2013; ESPINA et al., 2011).

Nos sucos, a aplicação de OEs em combinação ou em aplicação sequencial com TTM, tem sido bem-sucedida, devido à redução das concentrações dos aditivos alimentares e das temperaturas aplicadas nos tratamentos térmicos tradicionais (AIT-OUAZZOU et al., 2013). Na aplicação combinada do OE com TTM (40-60 °C), os efeitos sinérgicos são decorrentes de uma injúria subletal causada pelo calor que facilita o acesso e a ação dos compostos antimicrobianos do OE na célula bacteriana (AIT-OUAZZOU et al., 2011). Além disso, o TTM pode aumentar a eficácia antimicrobiana dos OEs através da vaporização dos constituintes voláteis que compõem os OEs, o que, por sua vez, aumenta a solubilização da membrana celular microbiana (BELLETI et al., 2007).

Em estudo anterior, foi avaliada a eficácia antimicrobiana dos OEs de hortelã, eucalipto e citrino combinados com TTM (70 °C ou 80 °C) frente à *Saccharomyces cerevisiae* inoculado em suco misto de fruta (maçã e laranja). O TTM (70 °C ou 80 °C durante 30, 60 e 90 s) aplicado isolado foi ineficaz na inativação de *S. cerevisiae*. Entretanto, o uso combinado dos tratamentos provocou uma redução da dose efetiva dos OEs frente *S. cerevisiae* como resultado da ação em sinergismo (TYAGI et al., 2014).

Outro estudo avaliou o efeito antimicrobiano de vanilina e citral em combinação com TTM frente a *Listeria monocytogenes* em suco de laranja. A adição de 25 ppm de citral reduziu o tempo necessário, para inativar 5 log₁₀ UFC/mL do patógeno alvo, em 2,4, 1,0 e 1,3 min a 57, 59 e 61 °C, respectivamente. A combinação do tratamento térmico aplicado com 900 ppm de vanilina reduziu 5 log₁₀ UFC/mL de *L. monocytogenes* em 5,1 e 4,5 min a 52 e 57 °C, respectivamente. Os efeitos do uso de 0,2 µL/mL dos OEs de *Mentha pulegium* L. e *Thymus*

algeriensis em combinação com TTM (54 °C por 10 min) também foram avaliados contra *E. coli* O157: H7 VTEC (Phage tipo 34) em suco de maçã. A incorporação dos OEs *M. pulegium* L. e *T. algeriensis* L. causou a redução do ciclo $\log_{10}$ de *E. coli* O157: H7 (8,2 e 5,0 min, respectivamente). Além disso, os OEs de *M. pulegium* L. e *T. algeriensis* L. causaram lesões subletais nas células sobreviventes de *E. coli* O157: H7 (CHAR; GUERREIRO; ALZAMORA, 2010).

Segundo Somolinos et al. (2010), o potencial efeito antimicrobiano do TTM (40-60 °C) com os OEs de *Citrus* spp. em sucos de frutas pode permitir a obtenção de produtos seguros sem comprometer as propriedades nutricionais e sensoriais originais. Estudos prévios avaliaram os efeitos antimicrobianos de diferentes concentrações de OE de laranja e o (+)- limoneno (50-200 ppm) em combinação com TTM (54-60 °C) frente a *E. coli* O157: H7 inoculada em suco de laranja e concluíram que ocorreu redução no tempo de aquecimento para inativar 5 $\log_{10}$ UFC/mL do patógeno alvo, demonstrando efeito sinérgico entre o OE e o TTM (ESPINA et al., 2014). Efeitos sinérgicos também foram observados ao utilizar 75 μ L/L de OECL combinado com TTM (54 °C) na inativação de 5 $\log_{10}$ UFC/mL de *E. coli* O157: H7 em suco de maçã (ESPINA et al., 2012). Entretanto, os efeitos dos OECL ou OECR aplicados isolados ou combinados com TTM sobre as funções fisiológicas de bactérias autóctones de deterioração de sucos de maçã e laranja ainda são desconhecidos.

3.4 CITOMETRIA DE FLUXO NA MICROBIOLOGIA

A busca por métodos de detecção rápida e confiável que avalie o estado fisiológico microbiano é crescente, isto porque as técnicas tradicionais de cultivo, tal como, plaqueamento ou contagem em placas de células viáveis apenas quantifica o número de células, mas não fornece informações sobre as funções estruturais e funcionais das células bacterianas (MACHETA et al., 2013; CIEMNIAK et al., 2018). Assim, o método baseado em fluorescência tem sido utilizado para analisar as funções fisiológicas das células além de monitorar as respostas unicelulares (ZHANG et al., 2018).

A citometria de fluxo (CF) é uma técnica que permite avaliar as funções fisiológicas das células bacterianas e medir simultaneamente múltiplas características biológicas, químicas e físicas das células (BREHM-STECHER, 2014). A análise de CF consiste no uso de um equipamento automatizado que combinado com fluorocromos/marcadores fluorescentes, enumeram, identificam e caracterizam as propriedades morfológicas e metabólicas das células. Os fluorocromos/marcadores são capazes de se ligar a partes específicas das células, absorver

energia luminosa a um determinado comprimento de onda e emitir luz fluorescente, que é detectado pelo equipamento (CAO et al., 2015).

O uso de fluorocromos/marcadores fluorescentes específicos evidencia possíveis alterações estruturais, funcionais e visam alvos celulares específicos, como a membrana citoplasmática, enzimas, DNA ou pH interno, que podem estar envolvidos no dano celular, em alterações na atividade respiratória, na atividade de bomba de efluxo, na funcionalidade do potencial da membrana, induzida por um ou mais tratamentos ou processos de inativação (FERRARIO; GUERRERO, 2017; ZHANG et al., 2018). Além disso, a dupla coloração com diferentes fluorocromos/marcadores é frequentemente usada para obter dados multiparamétricos de células individuais ou de subpopulações (LÉONARD et al., 2016). A combinação de vários fluorocromos/marcadores permite caracterizar uma população em subpopulações devido aos diferentes níveis de lesões nas células. Esta caracterização é aplicada as células que se encontram em um estado fisiológico intermediário entre metabolicamente ativa e morte celular (viável, mas não cultuável), e que consequentemente não são contabilizadas nos ensaios de cultivo (WILKINSON, 2016).

A CF também mede o padrão correspondente de espalhamento de luz de cada célula, que fornece informações sobre o tamanho e a granularidade das células, permitindo visualizar mudanças na forma celular, presença de detritos celulares ou perda de complexidade interna após a aplicação de um fator de estresse (ANANTA; KNORR, 2009). A obtenção de tais informações é importante pois auxilia na escolha do método e condições de inativação considerando os níveis de lesões induzidas pelos processos aplicados, bem como os mecanismos de ação envolvidos (CIEMNIAK et al., 2018).

A aplicação da CF na microbiologia possibilita compreender os mecanismos celulares que controlam a diferenciação celular em bactérias, verificar respostas a antibióticos, produtos químicos citotóxicos, antimicrobianos e processos de inativação. Ainda, é possível avaliar as alterações funcionais e metabólicas dos micro-organismos, bem como identificar genes expressos especificamente em determinadas condições nas estruturas celulares. Estas análises podem ser obtidas a partir de amostras de cultivo celular de bactérias, com obtenção rápida e precisa dos resultados da avaliação individual celular (AMBRIZ-AVIÑA; CONTRERAS-GARDUÑO; PEDRAZA-REYES, 2014; POSTERARO; SANGUINETTI, 2014).

As principais vantagens da CF para a microbiologia incluem avaliar elevado número de células por amostra (> 10.000 células), rapidez na obtenção de dados (1 a 2 min), resultados precisos em tempo real, volume reduzido de amostra, uso de diferentes fluorocromos/marcadores que possibilita analisar vários aspectos da estrutura, funcionalidade,

metabolismo e viabilidade celular, e menos trabalho e espaço laboratorial necessário em comparação com técnicas tradicionais (WILKINSON, 2016).

Alguns estudos têm reportado a aplicação da CF em diversas áreas que inclui: monitorar os efeitos de óleos essenciais em micro-organismos contaminantes de sucos (SOUSA GUEDES et al., 2016; ALMEIDA et al., 2019; BARBOSA et al., 2019) e de alimentos (PAPARELLA et al., 2008; ZHANG et al., 2016); monitoramento de fermentação (OVERTON, 2015); indústria de laticínios (YANACHKINA et al., 2016); análise de respostas orgânicas a contaminação por bactérias ou fungos (DU et al., 2015); produção de culturas e produtos probióticos (RAYMOND; CHAMPAGNE, 2015); e detecção de patógenos em diferentes etapas do processamento (HERRERO; DIAZ, 2015).

Portanto, a CF surge como uma técnica rápida, confiável e precisa na quantificação dos parâmetros celulares químicos (quantidade de proteína expressa, por exemplo), físicos (granulometria e tamanho) e na detecção das células viáveis ou não em uma determinada população de micro-organismos (BRAGA et al., 2016). Além de fornecer informações sobre as alterações na morfologia e no metabolismo de células bacterianas induzidas por métodos de inativação, o que além de contribuir para a escolha dos melhores tratamentos e condições para cada micro-organismos, auxilia na elucidação dos mecanismos de ação envolvidos em cada tratamento (LÉONARD et al., 2016). Considerando estes aspectos a CF foi eleita como a técnica a ser empregada no presente estudo para avaliar os efeitos do OECL ou OECR quando aplicado isolado ou em combinação com TTM sobre as funções fisiológicas das bactérias ácido lácticas deteriorantes de sucos de maçã e laranja.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES

O OECL e OECR foram extraídos através da hidrodestilação a vapor e adquiridos da Indulleida S. A. (Lleida, Espanha). As emulsões de OECL e OECR foram preparadas em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) em concentrações de 0,13 - 16 $\mu\text{L/mL}$ usando Tween 80 (1%, v/v, Sigma-Aldrich, EUA) como emulsionante (LEITE et al., 2016).

Os constituintes de OECL e OECR foram identificados através de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu, Kyoto, Japão). Os constituintes foram separados por uma coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O volume de injeção foi de 1 mL de OECL ou OECR diluído em hexano (1:10). A programação da temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 60 °C, com acréscimo de 3 °C por min até atingir 240 °C, concluindo o tempo de corrida equivalente a 60 min. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o gás hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 0,99 mL/min. O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons com uma temperatura da fonte de 200 °C, e com energia de ionização de 70 eV, variação de scan de m/z 40 a m/z 500. As amostras foram co-injetadas com a série homóloga de n-alcanos (C8-C20). A identificação dos constituintes voláteis de OECL ou OECR, foi realizada comparando seus espectros de massa com o Banco de Dados Espectral de Massa NIST/EPA/NIH (Instituto Nacional de Tecnologia de Normas, Norwalk, CT) e o FFNSC1.3 (Compostos Naturais e Sintéticos de Sabor e Fragrância). O índice de retenção (IR) de cada constituinte foi determinado pelo método de Kovats por co-injeção da série homóloga de n-alcanos (C8-C20) (ADAMS, 2001). A quantificação dos voláteis foi obtida através da normalização das áreas de cada constituinte detectado e expresso em porcentagem de área (%).

4.2 PREPARAÇÃO DOS SUCOS E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Os sucos incluídos no estudo, como matrizes experimentais, foram obtidos a partir das frutas maçã (*P. malus*) e laranja (*C. sinensis*), que foram adquiridas em comércio local (João Pessoa – Paraíba, Brasil). As frutas foram selecionadas por uniformidade do tamanho, forma, cor, aparência, ausência de lesões mecânicas e sinais visíveis de infecção. Para o preparo de cada suco, as superfícies das frutas foram sanitizadas por imersão de 5 min em uma solução de hipoclorito de sódio (0,15 $\mu\text{L/mL}$, pH 7,2) (SOUSA GUEDES et al., 2016). Em seguida, as frutas foram lavadas com água destilada, secas por 30 min em uma cabine de biossegurança,

descascadas de forma asséptica e cortadas em pedaços. Para obtenção do suco de maçã, utilizou-se 100 g da fruta em água destilada (1:2 p/v), em seguida, foi homogeneizado por 3 min em liquidificador doméstico (Britânia, Eletronic Inox Filter L66) previamente sanitizado. O suco de laranja foi extraído com auxílio de um espremedor de fruta doméstico (Cadence, Citro Plus) previamente sanitizado. Os sucos obtidos foram armazenados em alíquotas de 50 mL a -20 °C e, quando necessário, uma alíquota foi descongelada sob refrigeração ($4\pm 0,5$ °C) e utilizada para os ensaios subsequentes.

Para os ensaios de isolamento de BAL, foi utilizado 25 mL de cada suco em 225 mL da solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL). Em seguida, o sistema foi homogeneizado manualmente por 3 min a 28 °C e diluído seriadamente (10^{-1} a 10^{-5}) em solução salina estéril. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL de cada diluição foram inoculados em placas de Petri contendo ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia), ágar MRS suplementado com cloridrato de cisteína (MRS+ cis_HCl 0,05 g/100 mL) e em ágar M17, para isolamento de bactérias do gênero *Lactobacillus* (37 °C), *Bifidobacterium* (37-41 °C) e *Lactococcus* (30 °C), respectivamente. As placas foram incubadas em anaerobiose por 48-72 h (GARCIA et al., 2016).

Após o período de incubação foram selecionadas, pelos menos, cinco colônias autóctones que apresentaram morfologia típica. Em seguida, essas colônias foram isoladas aleatoriamente em placas contendo os meios de cultura, previamente citados, e incubadas em temperatura específica para cada gênero. Os isolados foram mantidos sob refrigeração ($4\pm 0,5$ °C) e, posteriormente, submetidos a testes de caracterização preliminar, tais como, coloração de Gram, atividade de catalase e oxidase (APHA, 2015). Todos os isolados autóctones presumidamente identificados como BAL (Gram-positivos, cocos ou hastes, catalase negativo e não-motilidade) foram armazenados a -20 °C em caldo MRS contendo glicerol (15 g/100 mL) para os ensaios subsequentes.

4.2.1 Identificação de isolados de bactérias ácido lácticas utilizando 16S rRNA Gene Sequence

A identificação do nível de espécies de isolados de BAL selecionados para o presente estudo foi realizada conforme descrito por Guo et al. (2010). O DNA genômico foi extraído usando um kit de extração de DNA Genomic (Promega Cooperation, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a amplificação das sequências do gene rRNA 16S, utilizaram-se os seguintes iniciadores: 27F, 50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30 e 1492R, 50-GGTTACCTTGTTACGACTT-30. As reações de PCR foram realizadas utilizando um

volume de 50 µL nas seguintes condições: ativação inicial à 94 °C por 2 min; ciclo de desnaturação à 94 °C por 30 s; passo de recozimento a 55 °C por 1 min; passo de extensão a 72 °C por 1 min; e ciclo final a 72 °C por 10 min (GUO et al., 2010). Os produtos de PCR foram purificados usando um kit de purificação de DNA (Invitrogen, Alemanha) e sequenciados usando os iniciadores 27F e 1492R em uma reação de sequenciamento ABI Prism™ BigDye™ (Applied Biosystems, EUA).

As sequências resultantes de 1465 pb foram analisadas usando as ferramentas Pregap4 e Gap4 no software STADEN 1.6. As sequências de rRNA 16S parciais foram comparadas com as sequências conhecidas no banco de dados Genbank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando o algoritmo da Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST) (GUO et al., 2010). Quando a sequência de consulta mostrou semelhança > 97% para a sequência do gene 16S rRNA, a identificação bacteriana foi confirmada.

4.3 CEPAS TESTE

Inicialmente, foram selecionados aleatoriamente para identificação 40 isolados de BAL, composto por 20 isolados de cada tipo de suco de fruta. As espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram as BAL mais predominantes (isolados 32/40) em ambos os sucos. Para o gênero de *Lactobacillus* foram encontradas as seguintes espécies: *L. plantarum* (n=8 isolado de suco de maçã; n=5 isolado de suco de laranja), *L. brevis* (n=3 isolado de suco de maçã; n=7 isolado de suco de laranja) e *L. fermentum* (n=2 isolado de suco de maçã; n=7 isolado de suco de laranja), e para o gênero de *Leuconostoc* foi encontrado *L. mesenteroides* (n=8 isolado de suco de laranja). O critério de seleção foi baseado em relatórios anteriores sobre essas espécies como deteriorantes de sucos de frutas (ESPIRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; CAMPOS; CRISTIANINI, 2007; ELEZ-MARTÍNEZ; ESCOLÁ-HERNÁNDEZ; SOLIVA-FORTUNY, 2005; BASAKA; RAMASWAMY; PIETTE et al., 2002). Assim, foi selecionado uma cepa de *L. plantarum* (isolada de suco de maçã), uma cepa de *L. brevis* e uma cepa de *L. mesenteroides* (isoladas de suco de laranja). As cepas estoque foram mantidas em criotubos contendo caldo MRS e glicerol (15 g/100 mL) a -80 °C.

4.4 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

As cepas teste foram cultivadas em placas de ágar MRS incubadas em anaerobiose a 37 °C por 18 horas. Após o período de incubação, cada cepa foi cultivada em 5 mL de caldo MRS e incubada, em anaerobiose, a 37 °C por 18 horas, para atingir a fase estacionária de

crescimento. Em seguida, a massa celular dos cultivos foi coletada por centrifugação (4500 g x 15 min, 4 °C), lavado duas vezes em solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL) e ressuspensa em 10 mL da mesma solução para obtenção de suspensões de células padrão.

As suspensões microbianas foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) em solução salina estéril. Cada diluição foi padronizada em espectrofotômetro (Spectro 500, Marte, Brasil) utilizando comprimento de onda de 625 nm mediante o valor de Densidade Óptica (DO). Para a determinação do número de Unidades Formadora de Colônias (UFC) de cada diluição, foram semeados na superfície de placas de ágar MRS um volume de 0,1 mL de cada diluição da suspensão de micro-organismos e, espalhados com auxílio de alça de Drigalsky. Posteriormente, as placas foram incubadas, em anaerobiose, a 37 °C por 24 h. Após incubação, as placas contendo o crescimento bacteriano foram submetidas à contagem do número de colônias formadas. Com o número de colônias obtido e corrigindo-se a respectiva diluição, foi determinado o número de células contidas no tubo para o comprimento de onda 625 nm, o valor da DO foi de 0,8 para *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. mesenteroides* que corresponde, aproximadamente, 8 log₁₀ UFC/mL (LEITE et al., 2016). A concentração final do inóculo microbiano nos sucos foi de 7 log₁₀ UFC/mL para fornecer uma contagem de células viáveis adequados para medir a redução de log₁₀ durante os diferentes tratamentos.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE OECL E OECR

A CIM do OECL e OECR contra *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. mesenteroides* foram determinadas através do método de microdiluição em caldo em microplaca de 96 poços de acordo com a padronização do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2015). Para a determinação da CIM, aproximadamente, 50 µL de cada uma das emulsões dos OEs (0,13 - 16 µL/mL) foram distribuídos em cada poço da microplaca. Em seguida, foram adicionadas, em cada poço, 50 µL do inóculo (aproximadamente 7 log₁₀ UFC/mL). Simultaneamente, foi realizado o controle de crescimento (positivo) e de esterilidade (negativo). A microplaca foi enrolada com um filme plástico para evitar a desidratação das células bacterianas e volatilização do OE, em seguida, foi incubada, em anaerobiose, a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, foi adicionado em todos os poços da microplaca um volume de 30 µL de resazurina (Inlab, Brasil), preparada em solução aquosa (0,01 g/100 L). A microplaca foi reincubada, em anaerobiose, a 37 °C por 20 min, quando então realizou-se a leitura visual. A permanência da cor azul nos poços foi interpretada como ausência do

crescimento bacteriano, enquanto que o desenvolvimento de cor roxa à rosa (ou incolor), presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de OE capaz de inibir o crescimento bacteriano (SOUSA GUEDES et al., 2016). Os testes foram realizados em triplicata.

A partir da determinação dos valores de CIM do OECL e OECR foram escolhidas as concentrações utilizadas para a determinação dos limiares sensoriais do OECL e OECR em suco de maçã e laranja.

4.6 DETERMINAÇÃO DOS LIMIARES DE ACEITAÇÃO COMPROMETIDA (LAC) E REJEIÇÃO (LR) DE OECL E OECR EM SUCOS DE FRUTAS

As análises sensoriais foram realizadas após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Universidade Federal da Paraíba, protocolo 1.125.993/2015; APÊNDICE A). As amostras de cada suco de frutas foram preparadas conforme descrito anteriormente (seção 4.2) e previamente submetidas a análises para determinar a conformidade dos padrões microbiológicos (BRASIL, 2000).

O LAC e o LR do OECL e OECR em sucos de frutas que indica o ponto de transição entre a aceitação e rejeição sensorial foram determinados de acordo com a metodologia previamente proposta e validada (LIMA FILHO et al., 2015; 2017). Para isso, 50 provadores não treinados (18 a 58 anos) foram pré-selecionados de acordo com seu interesse e a frequência do consumo de suco de maçã e laranja. As análises sensoriais incluíram cinco sessões de testes de aceitação (APÊNDICE B) (STONE; BLEIBAUM; THOMAS, 2012) e foram realizadas em cabines individuais sob temperatura e luz controlada. Em cada sessão, os provadores receberam uma amostra controle (suco de fruta sem adição de OECL ou OECR) e uma amostra de estímulo [(suco de fruta contendo diferentes concentrações de OECL ou OECR (2,0, 1,0, 0,50, 0,25, 0,13 µL/mL)]. Entre as sessões, a amostra de estímulo foi apresentada em ordem crescente de concentração de OECL ou OECR, e a posição da amostra de estímulo dentro de cada par foi randomizada (LIMA FILHO et al., 2017).

Cada amostra foi servida em alíquotas de 30 mL em copos descartáveis brancos codificados com um número aleatório de três dígitos, em forma simultânea e usando uma sequência aleatória. Em seguida, os provadores foram convidados a comparar as amostras e a atribuir uma pontuação que melhor refletisse sua avaliação em relação à aceitação de cada amostra. Os provadores analisaram as amostras da esquerda para a direita e descreveram seu julgamento utilizando uma escala hedônica de nove pontos variando de 1 (desgostei

extremamente) a 9 (gostei extremamente). Entre as sessões (intervalo de 5 min), os provadores foram convidados a utilizar biscoitos com baixo teor de sal e enxaguar a boca com água potável para limpar o palato. A cada intervalo de 5 min, os provadores receberam um novo par de amostras de suco de frutas.

Para cada sessão da análise sensorial, a determinação do LAC foi realizada utilizando o teste *t* pareado entre a pontuação hedônica da amostra de controle (HSCS) e a pontuação hedônica da amostra de estímulo (HSSS) (HSCS-HSSS). Os valores de *t* obtidos (eixo Y1) foram avaliados graficamente em função das concentrações de OEs testadas (eixo X). O ponto que ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras de controle e as amostras de estímulo (isto é, o ponto em que HSCS difere do HSSS), foi representado no gráfico por uma linha pontilhada (valor *t* tabulado). Para avaliar a LR do OECL ou OECR nos sucos de frutas, um segundo eixo Y (Y2-axis) que representa a pontuação hedônica média do HSSS foi inserido no gráfico. O ponto de transição entre a aceitação sensorial e a rejeição dos sucos de frutas foi representado no gráfico por uma linha tracejada referente à pontuação hedônica 5 (termo hedônico "indiferente") (DELLA LUCIA et al., 2014). Para determinar os valores de LAC e LR, os modelos de regressão foram ajustados para os pontos do gráfico (pontos do eixo Y1=CAT; Y2- pontos dos eixos = RT).

A partir da equação modelo, o LAC foi calculado considerando o valor *t* calculado igual ao valor *t* padrão ($p = 0,05$) (Y1 = valor *t* tabulado) e a LR foi calculado considerando o ponto onde a pontuação hedônica média para o OECL ou concentração de OECR torna-se igual a "indiferente" na escala hedônica (Y2 = 5). A validade dos modelos gerados foi determinada a partir do significado dos coeficientes de regressão e do coeficiente de determinação ($SS_{\text{regression}}/SS_{\text{total}}$).

4.7 AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE CEPAS TESTE POR OECL E OECR EM SUCOS DE FRUTAS

Para avaliar a inativação das cepas teste nos sucos de maçã ou laranja utilizando OECL ou OECR isolado ou em combinação com TTM (54 °C), os sucos foram previamente centrifugados (12.500 *g*, por 15 min, 4 °C) para separar a polpa do líquido restante. Em seguida, os sobrenadantes dos sucos foram filtrados utilizando uma camada de gaze e esterilizados por autoclave (121 °C, 1,1 atm, durante 15 min).

Inicialmente, uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana (aproximadamente 8 log₁₀ UFC/mL) de cada cepa foi inoculado em 9 mL de suco estéril contendo quantidades apropriadas

para a obtenção da concentração final desejada (0,13, 0,25 e 0,50 $\mu\text{L/mL}$ (concentrações abaixo do LR)) do OECL ou OECR. Os diferentes sistemas foram agitados suavemente por 30 s e incubados à temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Nos intervalos de 0 (imediatamente após a homogeneização), 2, 4, 6, 8, 10 e 12 min após a incubação, uma alíquota de 100 μL de cada sistema foi submetida a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) em solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL) e, em seguida 20 μL de cada diluição foram inoculados, utilizando a técnica da micro-gota, em placas de ágar MRS e incubados, em anaerobiose, a 37 °C por 24 h (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em $\log_{10}$ UFC/mL. Os sistemas controle, sem a adição do OECL ou OECR, foram ensaiados similarmente.

4.8 AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE CEPAS TESTE POR OECL OU OECR EM COMBINAÇÃO COM TTM EM SUCOS DE FRUTAS

Os intervalos de tempo de exposição e a temperatura, do presente estudo, foram selecionados com base em resultados de estudos anteriores que analisaram o efeito combinado de OEs e TTM para preservar sucos de frutas (ESPINA et al., 2011; ESPINA et al., 2012). Assim, os efeitos das concentrações, abaixo do LR, do OECL (0,13, 0,25 e 0,50 $\mu\text{L/mL}$) ou OECR (0,13, 0,25 e 0,50 $\mu\text{L/mL}$) nas contagens viáveis de cada cepa teste dos sucos de maçã e laranja em combinação com TTM (54 °C) foram avaliados após 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 min de exposição.

Inicialmente, alíquotas de 9 mL de suco estéril foram incubadas em banho-maria de agitação (Banho Dubnoff T6-053, Tecnal) com termostato regulado a 54 °C. Quando o ponto central de cada amostra de suco de fruta, com exceção do tempo 0 (imediatamente após a homogeneização), atingiu 54 °C, foi adicionado o OECL ou OECR em quantidades suficientes para atingir as concentrações finais desejada (0,13, 0,25 e 0,50 $\mu\text{L/mL}$). Posteriormente, uma alíquota de 1 mL de suspensão bacteriana (aproximadamente $8 \log_{10}$ UFC/mL) foi adicionada aos frascos. Após 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 min de exposição a 54 °C, uma alíquota de 100 μL de cada sistema foi diluída seriadamente (10^{-1} a 10^{-5}) em solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL) e, em seguida, 20 μL de cada diluição foram inoculados, utilizando a técnica da micro-gota, em placas de ágar MRS e incubados em anaerobiose a 37 °C por 24 h como descrito anteriormente (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). Os sistemas sem adição de OECL ou OECR foram testados de forma semelhante para avaliar os efeitos do TTM quando

aplicado isolado. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em $\log_{10}$ UFC/mL.

Para determinar a ocorrência de sinergismo entre OECL ou OECR em combinação com TTM, os resultados obtidos em aplicações combinadas foram comparados com os resultados teóricos correspondentes, que descreveram a soma da inativação causada por OECL, OECR ou TTM atuando individualmente (efeito aditivo) e os efeitos aumentados de OECL ou OECR e TTM atuando simultaneamente foram considerados efeitos sinérgicos (ARROYO et al., 2012).

4.9 MODELAGEM DAS CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DE CEPAS TESTE EM SUCOS TRATADOS COM OECL OU OECR EM COMBINAÇÃO COM TTM

As curvas de sobrevivência obtidas de cada cepa teste em suco de maçã e laranja tratado com OECL ou OECR em combinação com TTM foram ajustadas pela seguinte equação (MAFART et al., 2002):

$$\log \frac{N_t}{N_0} = \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (1)$$

onde t é o tempo de tratamento (min); N_t e N_0 são as densidades da população (UFC/mL) no tempo t e tempo zero, respectivamente, e δ e p são dois parâmetros característicos da equação. O valor δ é chamado de tempo para a primeira redução decimal (tempo necessário para inativar o primeiro ciclo $\log_{10}$ da população microbiana). O valor de p é um parâmetro de forma dependente do perfil da curva de sobrevivência: $p < 1$ para curvas de sobrevivência côncavas para cima, $p = 1$ para curvas de sobrevivência linear e $p > 1$ para curvas de sobrevivência côncavas para baixo. Os valores estimados de δ e p foram calculados com GraphPad PRISM (Graph Software, Inc., San Diego, CA). Uma vez que o perfil das curvas de sobrevivência foi descrito pela Equação 1, o tempo necessário para reduzir 3 $\log_{10}$ (valor de 3δ) foi estimado em função da concentração do OECL ou OECR e do tipo de suco avaliado.

4.10 EFEITO DO OECL OU OECR EM COMBINAÇÃO COM TTM SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS SUCOS DE FRUTAS

Para avaliar se as concentrações sensorialmente aceitas de OECL ou OECR utilizadas em combinação com a TTM modificam os parâmetros físico-químicos de sucos de maçã e laranja, as amostras submetidas ou não aos tratamentos combinados foram analisadas quanto ao teor de sólidos solúveis totais (SST), pH e acidez titulável (AT) utilizando procedimentos

padrão (AOAC, 2016). SST foi determinado utilizando um refratômetro digital (modelo HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brasil) (nº 932.12). Os valores de pH foram determinados utilizando um potenciômetro digital (modelo Q400AS, Quimis, São Paulo, Brasil) (nº 981.12) e a AT foi determinada usando fenolftaleína como um indicador com 0,1 N de NaOH e os resultados foram expressos em grama por 100 mL de equivalentes de ácido cítrico (nº 942.15).

4.11 EFEITO DO OECL, OECR OU TTM E DO TRATAMENTO COMBINADO SOBRE AS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS CEPAS TESTE

O suco de laranja, as cepas de *L. brevis* e *L. mesenteroides* e a concentração abaixo do LR do OECL ou OECR (0,50 µL/mL) em combinação com TTM (54 °C) foram selecionados com base nos resultados obtidos nas contagens de células viáveis de cada cepa teste onde o tratamento combinado diminuiu aproximadamente 5 log₁₀ UFC/mL de cepas de *L. brevis* e *L. mesenteroides* após 12 min de exposição no suco de laranja. Além disso, os intervalos de tempo (0, 6 e 12 min) foram definidos para avaliar os efeitos nas funções celulares no início, meio e fim do tratamento. Assim, os efeitos da concentração, abaixo do LR, do OECL ou OECR e do TTM aplicados isoladamente ou em combinação sobre as funções fisiológicas das cepas de *L. brevis* e *L. mesenteroides* foram avaliados após 0, 6 e 12 min de exposição em suco de laranja.

Inicialmente, alíquotas de 9 mL de suco de laranja foram incubadas em banho-maria de agitação (Banho Dubnoff T6-053, Tecnal) com termostato regulado a 54 °C. Quando o ponto central de cada amostra de suco de laranja, com exceção do tempo 0 (imediatamente após a homogeneização), atingiu 54 °C, foi adicionado o OECL ou OECR em quantidades suficientes para atingir a concentração final desejada (0,50 µL/mL). Posteriormente, uma alíquota de 1 mL da suspensão bacteriana (aproximadamente 8 log₁₀ UFC/mL) foi adicionada aos frascos. Após 6 e 12 min a 54 °C, as amostras foram centrifugadas (4500 g, 10 min, 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS; 8,0 g/L de NaCl, 0,20 g/L de KCl, 1,42 g/L de Na₂HPO₄, 0,24 g/L de KH₂PO₄, pH 7,4), e imediatamente marcadas com fluorocromos para avaliar as diferentes funções nas células bacterianas.

Para avaliar os efeitos do OECL ou OECR aplicados isoladamente nas cepas de *L. brevis* e *L. mesenteroides* no suco de laranja, os mesmos procedimentos foram realizados, sem aplicação do TTM, em temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Do mesmo modo, para avaliar os efeitos do TTM aplicado isoladamente, os mesmos procedimentos foram realizados sem adição

do OECL ou OECR. Células tratadas com etanol a 70% v/v foram analisadas de forma semelhante e consideradas como controle positivo do experimento (SILVA et al., 2010).

4.12 PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO

4.12.1 Integridade da membrana

A dupla coloração com laranja de tiazol (TO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada para avaliar danos no DNA e na integridade da membrana, respectivamente. O TO é um corante de DNA permeado por células e é usado para identificar partículas contendo DNA e pode entrar em células intactas e danificadas. O PI é um corante de DNA impermeável que entra apenas em células com membrana danificada, intercala o RNA e o DNA e se liga aos ácidos nucleicos (COMAS-RIU; RIUS, 2009). A dupla coloração foi realizada por incubação das células de *L. brevis* e *L. mesenteroides* (tratadas com OECL ou OECR e/ou TTM) suspensas em PBS com TO (1 µg/mL) e PI (1 µg/mL) por 5 min a 37 °C (SILVA et al., 2011).

4.12.2 Potencial da membrana

A dupla coloração com ácido bis-1,3-dibutilbarbúrico (BOX, Molecular Probes, Invitrogen, parte da Life Technologies, Eugene, OR, EUA) e o PI foi utilizado para avaliar o potencial de membrana e o dano na membrana, respectivamente. O BOX é um corante fluorescente capaz de indicar modificações no potencial de membrana, sendo acumulado por células despolarizadas ou excluído por células polarizadas (SILVA et al., 2011). A dupla coloração foi realizada por incubação de células de *L. brevis* e *L. mesenteroides* (tratadas com OECL ou OECR e/ou TTM) suspensas em PBS com 4 mM EDTA, BOX (2,5 mg/mL) e PI (1 µg/mL) por 5 min a 37 °C (SILVA et al., 2011).

4.12.3 Atividade respiratória

A atividade respiratória em células de *L. brevis* e *L. mesenteroides* tratadas com OECL ou OECR e/ou TTM foi avaliada usando cloreto de 5-ciano-2,3-ditolil tetrazólio (CTC, Polysciences, Warrington, PA, EUA). O CTC é reduzido pela cadeia de transporte de elétrons respiratórios a um formazan fluorescente insolúvel que indica atividade respiratória. Assim, as células respiratórias ativas acumulam as partículas fluorescentes de CTC-formazan, enquanto que as células respiratórias inativas não acumulam.

Inicialmente, as células de *L. brevis* e *L. mesenteroides* foram suspensas em PBS com 1% (p/v) de glicose (tratadas com OECL ou OECR e/ou TTM) e em seguida foram misturadas com 5 mM de CTC e incubadas a 37 °C por 30 min (SILVA et al., 2011).

4.12.4 Atividade de fluxo

O brometo de etídio (EB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), é um corante permeável a membrana e foi utilizado para medir a atividade de efluxo. O EB entra nas membranas celulares intactas, mas é bombeado ativamente para fora da célula por meio de um sistema de transporte antiporto de prótons não específico. Em células com membrana comprometida e atividade de bomba de efluxo alterada, o EB liga-se ao DNA intracelular (DÍAZ et al., 2010). Os procedimentos de coloração foram realizados por incubação de células de *L. brevis* e *L. mesenteroides* (tratadas com OECL ou OECR e/ou TTM) suspensas em PBS (1% de glicose; p/v) com EB (5 µg/mL) por 5 min a 37 °C (SILVA et al., 2011).

4.13 ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO (CF)

Após cada coloração as suspensões de células foram centrifugadas (4500 *g* x 10 min, 4 ° C) e lavadas com o volume igual de PBS para remover o excesso do corante (KIM et al., 2017). Os sedimentos de células obtidos foram ressuspensos em PBS e analisados utilizando um citômetro de fluxo equipado com um laser de íons de argon que emite a 488 nm (BD Accuri C6, New Jersey, USA). Os canais FL1 (533 nm ± 30 nm) e FL3 (> 670 nm) coletaram a fluorescência verde e vermelha, respectivamente. Os sinais de dispersão e fluorescência (medições da área de pulso) de células individuais que passam pela zona do laser foram coletados como sinais logarítmicos. Os filtros FL1 (TO e BOX) e FL3 (PI, EB e CTC) coletaram o sinal de fluorescência. O nível dos limiares para aquisição de dados foi estabelecido para a luz de dispersão frontal (*Forward Scatter* ou FSC) (10.000) e para eliminar ruídos ou partículas (de detritos celulares) considerados muito menores que as células intactas. Os parâmetros FSC e luz de dispersão lateral (*Side Scatter* ou SSC) (FSC/SSC) delimitaram as células bacterianas. Cada aquisição de amostra foi operada na baixa taxa de fluxo e um total de 10.000 eventos foram analisados.

4.14 ANÁLISE DOS DADOS DA CF

Os gráficos de densidade que indicam FSC *versus* SSC foram obtidos ao longo das medições. A FSC forneceu informações relativas sobre o tamanho das células e foi analisada

no plano do feixe e a SSC forneceu informações sobre a granularidade celular e foi medida a 90° em relação ao feixe do laser. Para determinar as propriedades de fluorescência das células foi aplicada a análise do gráfico de densidade de FL1 *versus* FL3.

Para a dupla coloração TO-PI, as células foram caracterizadas como segue: TO+ PI+ (portão superior direito; UR) correspondem a células danificadas e permeabilizadas; TO- PI- (portão inferior esquerdo; LL) pode indicar dano de DNA ou RNA, enquanto a membrana celular ainda pode estar intacta; TO+ PI- (portão superior esquerdo; UL) correspondem a células com membranas intactas e TO- PI+ (portão inferior direito; LR) correspondem a células permeabilizadas (SUROWSKY et al., 2014). Enquanto, para a dupla coloração com BOX-PI, as células que foram caracterizadas como: BOX- PI- (portão LL) correspondem a células polarizadas e não permeabilizadas; BOX+ PI- (portão UL) correspondem a células despolarizadas e não permeabilizadas; BOX+ PI+ (portão UR) correspondem a células despolarizadas e permeabilizadas e BOX- PI+ (portão LR) correspondem a células permeabilizadas polarizadas (HAMMER; HEEL, 2012).

Para determinar as propriedades de fluorescência das células CTC+ e EB+ foi aplicada a análise do gráfico de densidade de SSC *versus* FL3. As células CTC+ e EB+ representaram função respiratória não comprometida e células com atividade de bomba de efluxo alterada, respectivamente (LÉONARD et al., 2016; MORISHIGE; FUJIMORI; AMANO, 2015). Essas células foram agrupadas nos retângulos direitos. As análises de CF foram realizadas em dois experimentos independentes e em triplicata com resultados consistentes. A análise de dados foi realizada usando o Software BD Accuri C6 (BD®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EUA).

4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Para os ensaios de CIM, os resultados foram expressos como valores modais pois os valores da CIM foram os mesmos em todas as repetições. Para os ensaios de contagem de células viáveis e parâmetros físico-químicos, foram realizadas análises estatísticas para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$), assim, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Tukey ou teste t de Student. As barras de erro nas figuras indicam a média $\pm$ desvio padrão dos dados obtidos dos experimentos independentes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadruple mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.
- AGCAM, E.; AKYILDIZ, A.; EVRENDILEK, G. E. A comparative assessment of long-term storage stability and quality attributes of orange juice in response to pulsed electric fields and heat treatments. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, n. 1, p. 90-98, 2016.
- AIT-OUAZZOU, A.; ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 159-167, 2013.
- AIT-OUAZZOU, A.; CHERRAT, L.; ESPINA, L.; LORÁN, S.; ROTA, C.; PAGÁN, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 3, p. 320-329, 2011.
- ALMEIDA, E. T. C.; SOUZA, G. T.; SOUSA-GUEDES, J. P.; BARBOSA, I. M.; SOUSA, C. P.; CASTELLANO, L. R. C.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. *Mentha piperita* L. essential oil inactivates spoilage yeasts in fruit juices through the perturbation of different physiological functions in yeast cells. **Food Microbiology**, v. 82, n. 1, p. 20-29, 2019.
- AL-JABRI, N. N.; HOSSAIN, M. A. Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. **Journal of King Saud University – Science**, v. 30, n. 1, p. 14-20, 2018.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH (APHA). Compendium for the Microbiological Examination of Foods. Washington, DC: American Public Health, 2015.
- AMBRIZ-AVIÑA, V.; CONTRERAS-GARDUÑO, J. A.; PEDRAZA-REYES, M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 1-14, 2014.
- AMIRPOUR, M.; ARMAN, A.; YOLMEH, A.; AKBARI-AZAM, M.; MORADI-KHATOONABADI, Z. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. **Food Additives & Contaminants: Part B – Surveill**, v. 2, n. 8, p.142-8, 2015.
- ANANTA, E.; KNORR, D. Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 542-546, 2009.
- ARROYO, C.; CEBRIÁN, G.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S. Synergistic combination of heat and ultrasonic waves under pressure for *Cronobacter sakazakii* inactivation in apple juice. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 342-348, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL (AOAC). Official Methods of Analysis of Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Method No. 932.12, Method No. 981.12, Method N. 942.15. 20th ed. AOAC International, Washington.r4, 2016.

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI1, J. C.; KALIL, J.; AGONDI, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 34, n. 5, p. 1, 2011.

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, n. 2, p. 722-734, 2012.

BARBOSA, I. M.; ALMEIDA, E. T. C.; CASTELLANO, L. R. C.; SOUZA, E. L. Influence of stressing conditions caused by organic acids and salts on tolerance of *Listeria monocytogenes* to *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and damage in bacterial physiological functions. **Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 103240, 2019.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista da Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 377-89, 2005.

BASAK, S. The use of fuzzy logic to determine the concentration of betel leaf essential oil and its potency as a juice preservative. **Food Chemistry**, v. 240, n. 1, p. 1113-1120, 2018.

BASAKA, S.; RAMASWAMYA, H. S.; PIETTE, J. P. G. High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 3, p. 223-231, 2002.

BASSANETTI, I.; CARCELLI, M.; BUSCHINI, A.; MONTALBANO, S.; LEONARDI, G.; PELAGATTI, P.; TOSI, G.; MASSI, P.; FIORENTINI, L.; ROGOLINO, D. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. **Food Control**, v. 73, n. 1, p. 606-612, 2017.

BAZARGANI, M. M.; ROHLOFF, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. **Food Control**, v. 61, n. 1, p. 156-164, 2016.

BAZARGANI-GILANI, B.; ALIAKBARLU, J.; TAJIK, H. Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, n. 1, p. 280-287, 2015.

BELLETTI, N.; KAMDEM, S. S.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; CVELLI, A.; GARDINI, F. Antimicrobial activity of aroma compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of microbiological stability of soft drinks as assessed by logistic regression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 17, p. 5580-6, 2007.

BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by citrus extracts and a mild heat-treatment. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 553-559, 2013.

BONDONNO, N. P.; BONDONNO, C. P.; WARD, N. C.; HODGSON, J. M.; CROFT, K. D. The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. Isolated compounds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, n. 1, p. 243-256, 2017.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BRAGA, K. M. S.; PIMENTA, V. S. C.; RODRIGUES, F. A.; SANTOS, T. P.; ARAÚJO, E. G. A. Citometria de fluxo: histórico, princípios básicos e aplicações em pesquisa. **Enciclopédia biosfera**, v. 13, n. 23, p. 304, 2016.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Parâmetros analíticos e quesitos complementares aos padrões de identidade e qualidade de suco de fruta. Instrução Normativa Nº 37, de 1º de outubro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009. Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 5 jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Inspeção Vegetal. Serviço de Inspeção Vegetal. Instrução normativa n. 1, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2000.

BREHM-STECHER, B. F. **Flow cytometry**, 2014. p 943-953. In Batt CA, Tortorello ML. (ed), Encyclopedia of food microbiology, 2 ed, vol. 1, Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

CAO, G.; ZHANG, M.; MIAO, J.; LI, W.; WANG, J.; LU, D.; XIA, J. Effects of X-ray and carbon ion beam irradiation on membrane permeability and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Journal of Radiation Research**, v. 56, n. 2, p. 294304, 2015.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, n. 1, p. 111-119, 2015.

CAMPOS, F. P.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 226-229, 2007.

CARRILLO, M. G.; FERRARIO, M.; GUERRERO, S. Effectiveness of UV-C light assisted by mild heat on *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 inactivation in carrot-orange juice blend studied by flow cytometry and transmission electron microscopy. **Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 1-10, 2018.

CIEMNIAK, K.; CIELECKA-PIONTEK, J.; SZYMANOWSKA, D.; WIERGOWSKA, G. Intereactions between doripenem and clavulanate - Application of minimal inhibitory concentration analysis and cytometry flow for bactericidal studies. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 41-46, 2018.

CITRUSBR - **Associação nacional dos exportadores de sucos cítricos**, 2014.

Disponível em: < <http://www.citrusbr.com/>> Acesso em 01 de abril de 2019.

CITRUSBR - **Associação nacional de exportadores de frutos cítricos**, 2017. Disponível em: < <http://www.citrusbr.com/download/3-Consumo%20de%20Sucos%20em%20Geral.pdf> > Acesso em 01 de abril de 2019.

CITRUSBR - **Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos**, 2018.

<http://www.citrusbr.com/download/Relatorio_MAIO-2018_ano-civil.pdf> Acesso em 01 de abril de 2019.

COMAS-RIU, J.; RIUS, N. Flow cytometry applications in the food industry.

Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 36, n. 8, p. 999-101, 2009.

CHAR, C. D.; GUERREIRO, S. N.; ALZAMORA, S. M. Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice.

Food Bioprocess Technology, v. 3, n. 1, p. 752-61, 2010.

CHUECA, B.; RAMÍREZ, N.; ARVIZU-MEDRANO, S. M.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Inactivation of spoiling microorganisms in apple juice by a combination of essential oils' constituents and physical treatments. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 389-398, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, CLSI document M07 - A10. 10 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, 2015.

DELLA LUCIA, S. M.; MINIM, V. P. R.; SILVA, C. H. O.; MINIM, L. A.; CIPRIANO, P. A. Use of relative risk test to evaluate the influence of the brand on beer acceptability.

Semina: Ciências Agrárias, v. 35, n. 1, p. 2267-276, 2014.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1-2, p. 137-146, 2004.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; LOVINO, R.; SERVILI, M.; TATICCHI, A. Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 900-909, 2011.

DÍAZ, M.; HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; QUIRÓS, C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 385-407, 2010.

DU, L.; GROVER, A.; RAMANAN, S.; LITWIN, V. The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, n. 1. p. 3-10, 2015.

ELEZ-MARTÍNEZ, P.; ESCOLÁ-HERNÁNDEZ, J.; SOLIVA-FORTUNY, R. C.; MARTÍN-BELLOSO, O. Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high-intensity pulsed electric fields. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 311-319, 2005.

EISELE, T. A.; DRAKE, S. R. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 2-3, p. 213-21, 2005.

ESPINA, L.; CONDÓN, S.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Synergistic effect of orange essential oil or (+)-limonene with heat treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice at lower intensities while maintaining hedonic acceptability. **Food Bioprocess and Technology**, v. 7, n. 8, p. 471-481, 2014.

ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; LAGLAOUI, A.; MACKEY, B. M.; PAGÁN, R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 23-30, 2013.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; AIT-OUAZZOU, A.; CONDÓN, S.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 1, p. 9-16, 2012.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

ESPIRITO-SANTO, A. P.; CARLIN, F.; RENARD, C. M. G. C. Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth? - A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. **Food Research International**, v. 78, n. 1, p. 352-60, 2015.

FANCELLO, F.; PETRETTO, G. L.; ZARA, S.; SANNA, M. L.; ADDIS, R.; MALDINI, M. T.; FODDAI, M.; ROURKE, J. P.; CHESSA, M.; PINTORE, G. Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of *Citrus limon* var. pompia leaf essential oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, n. 1, p. 579-585, 2016.

FACCHINETTI, C. Market & Business: Food Production. **Agroanalysis**, v. 1, n. 1, p. 20-21, 2018.

FAYAZ, G.; GOLI, S. A. H.; KADIVAR, M.; VALOPPI, F.; BARBA, L.; CALLIGARIS, S.; NICOLI, M. C. Potential application of pomegranate seed oil oleo gels based on monoglycerides, beeswax and propolis wax as partial substitutes of palm oil in functional chocolate spread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, n. 1, p. 523-529, 2017.

FERRARIO, M.; GUERRERO, S. Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in apple juice. **Food Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 83-94, 2017.

FERREIRA, J. A. F. **Panorama das doenças transmitidas por Alimentos no Brasil entre 2000 e 2015**. 2017. 76 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde Pública), Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n.3, p. 156-164, 2008.

FOUAD, H. A.; CAMARA, C. A. G. Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 73, n. 1, p. 30-36, 2017.

FUJIYOSHIA, T.; IKAMI, T.; KIKUKAWA, K.; KOBAYASHIA, M.; TAKAI, R.; KOZAKI, D.; YAMAMOTO, A. Direct quantitation of the preservatives benzoic and sorbic acid in processed foods using derivative spectrophotometry combined with micro dialysis. **Food Chemistry**, v. 240, n. 1, p. 386-390, 2018.

FLAMINI, G.; TEBANO, M.; CIONI, P. L. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limon*. **Analytica Chimica Acta**, v. 589, n. 1, p. 120-124, 2007.

GARCIA, E. F.; LUCIANO, W.; XAVIER, D.; COSTA, W. K. A.; OLIVEIRA, K.; FRANCO, O.; MORAIS, M.; LUCENA, B.; PICÃO, R.; MAGNANI, M.; SAARELA, M.; SOUZA, E. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing by products and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 7-1371, 2016.

GIATROPOULOS, A.; PAPACHRISTOS, D. P.; KIMBARIS, A.; KOLIOPOULOS, G.; POLISSIOU, M. G.; EMMANOUEL, N.; MICHAELAKIS, A. Evaluation of bioefficacy of three *Citrus* essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2253-2263, 2012.

GOMES-NETO, N. J.; LUZ, I. S.; FRANCO, O. L.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Tolerance evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by exposure of sublethal amounts of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and 1,8-cineole in meat-model. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 1912-1917, 2014.

GÓMEZ, P. L.; WELTI-CHANES, J.; ALZAMORA, S. M. Hurdle technology in fruit processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 447-465, 2011.

GUERROUJA, K.; SÁNCHEZ-RUBIOB, M.; TABOADA-RODRÍGUEZC, A.; CAVA-RODAC, R. M.; MARÍN-INIESTAB, F. Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, n. 1, p. 20-28, 2016.

GUO, X. H.; KIM, J. M.; NAM, H. M.; PARK, S. Y.; AND KIM, J. M. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. **Anaerobe**, v. 16, n. 4, p. 321-326. 2010.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - a review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 315-324, 2013.

HAMMER, K. A.; HEEL, K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 239-245, 2012.

HASHIMOTO, H.; URAGAMI, C.; COGDELL, R. J. Carotenoids and photosynthesis. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 111-139, 2016.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.

HERRERO, M.; DIAZ, M. Application of flow cytometry to environmental biotechnology. In M. G. Wilkinson (Ed.). **Flow cytometry in Microbiology: Technology and applications**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2015, p. 59-75.

HUANG, K.; TIAN, H.; GAI, L.; WANG, J. A review of kinetic models for inactivating microorganisms and enzymes by pulsed electric field processing. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 191-207, 2012.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-24, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção Agrícola Municipal – Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 14 junho 2019.

JAY, S.; ANDERSON, J. Fruit juice and related products. In: Moir CJ, andrew-Kabilafkas C, Arnold G, Cox BM, Hocking AD, Jenson I, eds. **Spoilage of Processed foods: Causes and Diagnosis**. Marrickville: Southwood Press, v. 2014, n. 1, p. 187-98, 2001.

KALINOWSKA, M.; BIELAWSKA, A.; LEWANDOWSKA-SIWKIEWICZ, H.; PRIEBE, W.; LEWANDOWSKI, W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 169-188, 2014.

KIM, D. K.; KIM, S. J.; KANG, D. H. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength VC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. **Food Research International**, v. 97, n. 1, p. 280-287, 2017.

KHORSHIDIAN, N.; YOUSEFI, M.; KHANNIRI, E.; MORTAZAVIAN, A. M. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, n. 1, p. 62-72, 2018.

LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. **Food Research International**, v. 25, n. 2, p. 151-158, 1992.

LEROY, F.; VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LEITE, C. J. B.; SOUSA, J. P.; MEDEIROS, J. A. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SOUZA, E. L. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. Essential oil in pineapple juice. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 2, p. 213-219, 2016.

LÉONARD, L.; CHIBANE, L. B.; BOUHEDDA, B. O.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, N. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2016.

LIMA FILHO, T.; LUCIA, S. M. D.; MINIM, V. P. R.; SILVA, R. C. S. N.; MINIM, L. A. Validation of the hedonic threshold methodology in determining the compromised acceptance threshold. **Journal of Sensory Studies**, v. 32, n. 2, p. 12255, 2017.

LIMA FILHO, T.; MINIM, V. P. R.; SILVA, R. C. S. N.; LUCIA, S. M. D.; MINIM, L. A. Methodology for determination of two new sensory thresholds: Compromised acceptance threshold and rejection threshold. **Food Research International**, v. 76, n.1, p. 561-566, 2015.

LIMA, E. C. S.; DAER, J. C.; WILHELMI, L. S.; CARDOSO, M. H.; TEIXIERA, A. B. S. Efeito da pasteurização sobre propriedades químicas, microbiológicas e sensoriais de bebida mista formulada com inhame (*Diospora* sp) e limão tahiti (*Citrus latifolia* tanaka). **Acta tecnológica**, v. 7, n. 2, p.44-48, 2012.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

MACHETA, A.; RADKO, K.; SZYMCHYK, A.; PODHORECKA, M. The technique of flow cytometry in diagnostic research. **Advances in Science and Technology Research Journal**, v. 7, n. 19, p. 55-59, 2013.

MAFART, P.; COUVERT, O.; GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 107-113, 2002.

MALDONADO-BARRAGÁN, A.; CABALLERO-GUERRERO, B.; LUCENA-PADRÓS, H.; RUIZ-BARBA, J. L. Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. **Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 40-77, 2013.

MARQUES, J. L.; VOLCÃO, L. M.; FUNCK, G. D.; KRONING, I. S.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M.; RIBEIRO, G. A. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, v. 77, n. 1, p. 444-450, 2015.

MENEZES, N. M. C.; MARTINS, W. F.; LONGHI, D. A.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the effect of oregano essential oil on shelf-life extension of vacuum-packed cooked sliced ham. **Meat Science**, v. 139, n. 1, p. 113-119, 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Mapa vai lançar plano para aumentar exportações de frutas, 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-vai-lancar-plano-para-aumentar-exportacoes-de-frutas>> Acesso em 10 de jan. 2018.

MORISHIGE, Y.; FUJIMORI, K.; AMANO, F. Use of flow cytometry for quantitative analysis of metabolism of viable but non-culturable (VBNC) *Salmonella*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 9, p. 1255-1264, 2015.

MOUSAVI, A.; MAHDAVI, A. H.; RIASI, A.; SOLTANI-GHOMBAVANI, M. Synergetic effects of essential oils mixture improved egg quality traits, oxidative stability and liver health indices in laying hens fed fish oil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, n. 1, p. 162-172, 2017.

NANNAPANENI, R.; CHALOVA, V. I.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C.; JOHNSON, M. G.; O'BRYAN, C. A. Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 43-49, 2009.

OVERTON, T. W. Flow cytometry of yeasts and other fungi. In M. G. Wilkinson (Ed.). **Flow cytometry in Microbiology: Technology and applications**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, p. 119-158, 2015.

PAPARELLA, A.; TACCOGNA, L.; AGUZZI, I.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; MARSILIO, F.; SUZZI, G. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1174-1182, 2008.

PARAVISINI, L.; PETERSON, D. G. Mechanisms non-enzymatic browning in orange juice during storage. **Food Chemistry**, v. 289, n. 1, p. 320-327, 2019.

PETRUZZI, L.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Thermal treatments for fruit and vegetable Juices and beverages: a literature overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 4, p. 668-691, 2017.

POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. The future of fungal susceptibility testing. **Future Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 947-67, 2014.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 546-553, 2007.

PRADO, D. B.; SZCZEREPA, M. M. A.; CAPELOTO, O. A.; ASTRATHD, N. G. C.; SANTOS, N. C. A.; PREVIDELLI, I. T. S.; NAKAMURA, C. V.; MIKCHA, J. M. G.; ABREU FILHO, B. A. Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. **International Journal Food Microbiology**, v. 305, n. 1, p. 108238, 2019.

RAYMOND, Y.; CHAMPAGNE, C. P. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. **Food Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 176-183, 2015.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 1, p. 250-264, 2014.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; ROBERT SOLIVA-FORTUNY, R.; IN-BELLOSO, A. O. M. Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 1, p. 157-180, 2009.

ROLLER, S.; SEEDHAR, P. Carvacrol and cinnamic acid inhibit microbial growth in fresh-cut melon and kiwi fruit at 4 °C and 8 °C. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 390-394, 2002.

SEOW, Y. X.; YEO, C. R.; CHUNG, H. L.; YUK, H. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 1479-1486, 2011.

SILVA, F.; LOURENÇO, O.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. The use of DRAQ5 to monitor intracellular DNA in *Escherichia coli* by flow cytometry. **Journal of Fluorescence**, v. 20, n. 1, p. 907-914, 2010.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2007.

SINGH, G. M.; MICHA, R.; KHATIBZADEH, S.; SHI, P.; LIM, S.; ANDREWS, K. G.; ENGELL, R. E.; EZZATI, M.; MOZAFFARIAN, D. Global, regional, and national consumption of sugar-sweetened beverages, fruit juices, and milk: a systematic assessment of beverage intake in 187 countries. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. 1-20, 2015.

SONGSAMOE, S.; MATANAN, N.; MATAN, N. Antifungal activity of *Michelia alba* oil in the vapor phase and the synergistic effect of major essential oil components against *Aspergillus flavus* on brown rice. **Food Control**, v. 77, n. 1, p. 150-157, 2017.

SOUSA, J. P.; AZERÊDO, G. A.; TORRES, R. A.; VASCONCELOS, M. A. S.; CONCEIÇÃO, M. L.; SOUZA, E. L. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated to minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 141-151, 2012.

SOUSA GUEDES, J. P. S.; MEDEIROS, J. A. C.; SILVA, R. S. S.; SOUSA, J. M. B.; CONCEIÇÃO, M. L.; SOUZA, E. L. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in

cashew, guava, mango, and pineapple juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, n. 1, p. 183-192, 2016.

SOUZA, E. L.; ALMEIDA, E. T. C.; SOUSA GUEDES, J. P. The potential of the incorporation of essential oils and their individual constituents to improve microbial safety in juices: A review. **Comprehensive Reviews Food Science Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 753-772, 2016.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SOMOLINOS, M.; ESPINA, L.; PAGÁN, R.; GARCÍA, D. sigB absence decreased *Listeria monocytogenes* EGD-e heat resistance but not its Pulsed Electric Fields resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 32-38, 2010.

SUROWSKY, B.; FRÖHLING, A.; GOTTSCHALK, N.; SCHLÜTER, O.; KNORR, D. Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: inactivation kinetics and mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, n. 1, p. 63-71, 2014.

SHAH, J.; DESAI, P. T.; CHEN, D.; STEVENS, J. R.; WEIMER, B. C. Pre-adaptation to cold Stress in *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium increases survival during subsequent acid stress exposure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 281-289, 2013.

SNYDER, A. B.; WOROBO, R. W. The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. **Food Control**, v. 85, n. 1, p. 144-150, 2018.

STONE, H.; BLEIBAUM, R. N.; THOMAS, H. A. Sensory evaluation practices. **4 ed. New York: Academic Press**, 2012. 446 p.

SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. Lemon scented plants. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

TADTONG, S. K.; WATTHANACHAIYINGCHAROEN, R.; RUANGRUNGSI, N.; Chemical components of four essential oils in aromatherapy recipe. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, p. 1091-1092, 2015.

TAO, N.; JIA, L.; ZHOU, H. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Food Chemistry**, v. 153, n. 1, p. 265-271, 2014.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. G. M. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of species and application in food production. **Food Reviews International**, v. 26, n. 3, p. 205-229, 2010.

TONIOLO, R.; PIZZARIELLO, A.; SUSMEL, S.; DOSSI, N.; BONTEMPELLI, G. A. Sensor on electrodes supported on ion-exchange membranes for the flow-injection monitoring of sulfur dioxide in wines and grape juices. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1809-15, 2010.

TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; ARZANI, A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. **Food Chemistry**, v. 220, n. 1, p. 153-161, 2017.

TYAGI, A. K.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M. E. Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. **Food Chemistry**, v. 37, n. 1-4, p. 108-114, 2013.

VALLY, H.; MISSO, N. L. A.; MADAN, V. Clinical effects of sulphite additives. Clin. Exp. Allergy 39, 1643-1651. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 1643-51, 2009.

VEGARA, S.; MARTÍ, N.; MENA, P.; SAURA, D.; VALERO, M. Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 592-596, 2013.

VITALI, B.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; SPISNI, E.; MACCAFERRI, S.; BRIGIDI, P.; GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 116-125, 2012.

WILSON, B. G.; BAHNA, S. L. Adverse reactions to food additives. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 95, n. 6, p. 499-507, 2005.

WILKINSON, M. G. **Flow cytometry in food Microbiology: Challenges, opportunities and progress to date.** Laboratory Techniques, v. 417, n. 1, p. 722-728, 2016.

WŁODARSKA, K.; PAWLAK-LEMANSKA, K.; KHMELINSKII, I.; SIKORSKA, E. Explorative study of apple juice fluorescence in relation to antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 210, n. 1, p. 593-599, 2016.

YANACHKINA, P.; MCCARTHY, C.; GUINEE, T.; WILKINSON, M. Effect of varying the salt and fat content in Cheddar cheese on aspects of the performance of a commercial starter culture preparation during ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 224, n. 1, p. 7-15, 2016.

ZHANG, C.; CHEN, X.; XIA, X.; LI, B.; HUNG, Y. C. Viability assay of *E. coli* O157: H7 treated with electrolyzed oxidizing water using flow cytometry. **Food Control**, v. 88, n. 1, p. 47-53, 2018.

ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; QUEK, S.Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, n. 1, p. 282-289, 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão produzidos durante o desenvolvimento da tese estão expostos em formato de artigos científicos, submetidos em revistas científicas indexadas na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos e formatados de acordo com as normas dos periódicos.

ARTIGO 1: Control of autochthonous spoilage lactic acid bacteria in apple and orange juices by sensorially accepted doses of *Citrus* spp. essential oils combined with mild heat treatments

(Artigo aceito no periódico Journal of Food Science, Fator de Impacto 2,081)

ARTIGO 2: Effects of *Citrus lemon* and *C. reticulata* essential oils in combination with mild heat treatment on physiological functions of autochthonous spoilage bacteria in orange juice

(Artigo submetido ao periódico International Journal of Food Microbiology, Fator de Impacto 4,006)

5.1 ARTIGO 1: Control of autochthonous spoilage lactic acid bacteria in apple and orange juices by sensorially accepted doses of *Citrus* spp. essential oils combined with mild heat treatments

(Artigo aceito no periódico Journal of Food Science, Fator de Impacto 2,081)

Control of autochthonous spoilage lactic acid bacteria in apple and orange juices by sensorially accepted doses of *Citrus* spp. essential oils combined with mild heat treatments

Running title: *Citrus* oil and heat to preserve juices

Geany Targino de Souza Pedrosa¹, Rayssa Julliane de Carvalho¹, Daniel Berdejo³, Evandro Leite de Souza², Rafael Pagán³, Marciane Magnani^{1*}

¹ *Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

² *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

³ *Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain*

*Corresponding author:

Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Brazil. E-mail: magnani@gmail.com; phone number: +55 83 3216 7576; fax number: +55 83 3216 7354

Abstract

This study assessed the compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT) of *Citrus lemon* (CLEO) and *Citrus reticulata* essential oil (CREO) in apple and orange juices. The efficacy of CLEO and CREO concentrations below the RT were evaluated alone and combined with mild heat treatment (MHT) (54 °C, up to 12 min) to inactivate the autochthonous spoilage bacteria *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* in apple and orange juices. The CAT of CLEO and CREO varied from 0.15 to 0.17 µL/mL in orange and apple juices. The RT of CLEO was approximately 0.58 µL/mL in apple and orange juices, and the RT of CREO was 0.68 µL/mL in both juices. When CLEO and CREO were assayed alone, the highest concentration (0.50 µL/mL) decreased counts of all strains approximately 2 log₁₀ CFU/mL after 12 min of exposure to 54 °C. All concentrations of CLEO or CREO in combination with MHT acted synergistically against *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides*. Decreases in counts varied with the strain, CLEO and CREO concentrations, juice type and exposure time to the combined treatment. CREO was more effective than CLEO in combination with MHT against the strains in apple and orange juices. Effective combinations of CLEO or CREO with MHT to control the autochthonous spoilage bacteria did not compromise the quality parameters (°Brix, pH and titratable acidity) that characterize unsweetened juices. These results indicate CLEO or CREO at concentrations below the sensory RT in combination with MHT as a feasible technology to control autochthonous spoilage bacteria in fresh fruit juices.

Keywords: Essential oils, heat treatments, sensory threshold, lactic acid bacteria, fruit beverages.

Practical Application

The present study provides novel information concerning the efficacy of sensorially accepted doses of CLEO and CREO combined with MHT against autochthonous spoilers in fruit juice. The valuable synergistic effects that can be observed when combining CLEO and CREO with MHT reveal a feasible preservation technology and alternative to traditional treatments that are successful because they help reduce treatment intensity, thereby avoiding adverse effects on the sensory, physicochemical and nutritional properties of these products.

Introduction

Fresh fruit juices are appreciated and consumed worldwide because of their refreshing properties, nutritional value and health-promoting components (Singh et al., 2015). However, the contamination of fruit juices with lactic acid bacteria naturally present in the fruit may result in loss of nutrients and undesirable sensory alterations (Snyder & Worobo, 2018; Guerrouja, Sánchez-Rubiob, Taboada-Rodríguezc, Cava-Rodac, & Marín-Iniestab, 2016).

Lactobacillus spp. and *Leuconostoc* spp. are common genera of the lactic acid bacteria population found in raw fruits (Di Cagno et al., 2011); therefore, they are easily transferred to juices (Jay & Anderson, 2001). Species of these genera are well-known spoilage bacteria in raw juices because they produce metabolic end-products such as lactic acid, diacetyl, CO₂, ethanol, and acetic or formic acid that generate off-flavor and off-odor (Basak, Ramaswamy, & Piette, 2002; Jay & Anderson, 2001). Spoilage microorganisms are classically inactivated in fruit juices by high temperatures (72 to 82 °C for 0.3 to 15 s) or antimicrobial agents (e.g., benzoic and sorbic acids and sulfur dioxide) (Vally, Misso, & Madan, 2009). However, high temperatures destroy heat-sensitive nutrients such as vitamins compromising fruit juice freshness (Hu, Zhou, Xu, Zhang, & Liao, 2013).

The use of essential oils (EOs) obtained from *Citrus lemon* (CLEO) and *Citrus reticulata* (CREO) has been considered to preserve fruit juices because of their activity against juice-related bacteria (Espina, Somolinos, Lorán, Conchello, García-Gonzalo, & Pagán, 2011; Espina, Somolinos, Ait Ouazzou, Condón, García-Gonzalo, & Pagán, 2012; Espina, García-Gonzalo, & Pagán, 2014a). Both CLEO and CREO are generally recognized as safe for use in foods and beverages (U.S. Code of Federal Regulations 8008-56-8 for CLEO and 8016-85-1 for CREO). However, the strong flavor and taste characteristic of most EOs have limited the use of EOs as preservatives in fruit juices. The effective concentrations of EOs against spoilage and pathogenic microorganisms typically exceed the sensory rejection threshold (RT) (Almeida, Barbosa, Tavares, Barbosa Filho, Magnani, & De Souza, 2018).

The combined use of *Citrus* spp. EOs with mild heat treatment (MHT) may be an alternative approach for use as antimicrobials in fruit juices (Calo, Crandall, O'Bryan, & Ricke, 2015; Espina et al., 2012). The efficacy of *C. sinensis* EO and CLEO in combination with MHT against the pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in apple (Espina et al., 2012) or orange (Espina et al., 2014a) juice was previously reported. However, the concentrations evaluated in those studies, alone or in combination with MHT, did not consider the sensory threshold of the tested EOs in the juices. No previous studies assessed whether concentrations sensorially accepted for CLEO or CREO are effective, alone or in combination with MHT, to inactivate the autochthonous spoilage bacteria in juices.

Therefore, this study was performed to i) determine the sensory thresholds of CLEO and CREO in apple and orange juices, ii) isolate and identify spoilage lactic acid bacteria from the autochthonous microflora and iii) assess the efficacy of CLEO and CREO concentrations below the sensory threshold rejection, alone and combined with MHT, to inactivate the selected autochthonous spoilage bacteria.

Materials and methods

EOs and chemical composition

CLEO and CREO extracted through steam distillation were purchased from Indulleida S.A. (Lleida, Spain). The constituents of CLEO and CREO were identified using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) using a chromatography model CGMS-QP2010 (Ultra Shimadzu, Kyoto, Japan). GC-MS analysis was performed under the following conditions: an RTX-5MS capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m); program temperature 60-240 °C (3 °C/min); injector temperature 250 °C; detector temperature 220 °C; carrier gas helium adjusted to 0.99 mL/min speed; ionizing energy 70 eV; and mass range (m/z) 40-500. Samples were co-injected with the homologous series of n-alkanes (C8-C20). Each component was identified by comparing its mass spectra with the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (National Institute of Standards Technology, Norwalk, CT) and FFNSC1.3 (Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds). The retention index (RI) of each constituent was determined by the Kovats method by co-injection of the homologous series of n-alkanes (C8-C20) (Adams, 2001). The EO constituents were quantified after normalizing the areas of each detected constituent and expressed as a percentage of area (%).

Preparation of juices

Apple (*Pyrus malus*) and orange (*Citrus sinensis*) fruits were purchased from a local wholesale distributor (João Pessoa, Brazil). To minimize variation among the fruits used to produce the juices, the fruits were selected for uniformity in size, form, color, and appearance and for absence of mechanical injuries and visible signs of infection. To prepare the juices, the fruits were surface disinfected by a 5 min immersion in a sodium hypochlorite solution (0.15 μ L/mL, pH 7.2), washed with sterile distilled water and dried for 30 min in a biosafety cabinet. Apple juice was prepared by mixing 100 g of apple pulp (aseptically peeled) with distilled water

(1:2 w/v) using a domestic blender (for 3 min), and orange juice was extracted from ripe fruit using a domestic squeezer. The juices were stored in 50 mL aliquots at -20 °C, and when required, an aliquot was thawed under refrigeration (4 ± 0.5 °C) and used for subsequent assays.

Isolation and identification of the autochthonous isolates

To isolate the autochthonous spoilage lactic acid bacteria, 25 mL of each fresh juice prepared as described was dispensed into 225 mL of sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL), homogenized (3 min) at room temperature and serially diluted (10^{-1} to 10^{-5}). Subsequently, 100 μ L of each dilution was inoculated onto de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (HiMedia), MRS agar supplemented with cysteine hydrochloride (0.05 g/100 mL) and M17 agar (HiMedia) to isolate species belonging to the genera *Lactococcus* (30 °C), *Lactobacillus* (37 °C), and *Bifidobacterium* (37 - 41 °C), respectively. The plates were incubated anaerobically using an Anaerobic System AnaeroGen, (ASA; Oxoid) for 48 - 72 h (Garcia et al., 2016).

At least five autochthonous colonies with different morphologies were isolated in each specific medium at the proper temperature for each genus and maintained under refrigeration (4 ± 0.5 °C). Each isolate was subjected to analyses of Gram staining, morphology, catalase production and motility using standard procedures (APHA, 2015). Isolates presumptively identified as lactic acid bacteria (nonmotile, catalase negative, Gram-positive cocci or rods) were stored at -20 °C in MRS broth containing glycerol (15% v/v) for further studies.

The isolates were identified at the species level as previously described (Guo, Kim, Nam, Park, & Kim, 2010). Genomic DNA was extracted using a Genomic DNA extraction kit (Promega Corporation, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. To amplify the 16S rRNA gene sequences, the following primers were used: 27F, 5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3, and 1492R, 5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3. PCRs were conducted in a volume of 50 μ L under the following conditions: initial activation at 94 °C

for 2 min, denaturation at 94 °C for 30 s; annealing at 55 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min, and a final cycle at 72 °C for 10 min. PCR products were purified using a DNA purification kit (Invitrogen, Germany) and sequenced using the 27F and 1492R primers in a sequencing reaction using an ABI Prism™ BigDye™ terminator cycle sequencing reaction kit (Applied Biosystems, USA). The resulting 1465 bp sequences were analyzed using the Pregap4 and Gap4 tools in the STADEN 1.6 software. Partial 16S rRNA sequences were compared to those available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database using the Local Alignment Search Tool (BLAST) (Guo et al., 2010). Only query sequences with similarity >97% were considered for bacterial identification.

Test strains and inoculum preparation

Stock cultures were maintained in cryovials with MRS broth containing glycerol (15 g/100 mL) at -80 °C. Each inoculum was obtained by preparing suspensions in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) from overnight cultures grown anaerobically (ASA) in MRS broth at 37 °C for 18 h to reach stationary growth phase (time determined considering the data of growth behavior assays of the test strains). Cells were harvested using centrifugation (4500 *g* x 15 min, 4 °C), washed twice and resuspended in sterile saline solution to obtain standard cell suspensions with an optical density (OD) at 625 nm (OD₆₂₅) of 0.8. These suspensions provided viable counts of approximately 8 log₁₀ colony forming units per milliliter (CFU/mL) for all strains (Leite et al., 2016). A final concentration of 7 log₁₀ CFU/mL of the test strains was used in the juices to provide a number of viable cells suitable for measuring the log₁₀ reduction during the treatments.

Minimum inhibitory concentration (MIC) of CLEO and CREO

The MIC of CLEO and CREO against *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* was determined using a microdilution in broth assay (CLSI, 2015) with minor modifications. The

stock emulsions ($32 \mu\text{L/mL}$; $\text{pH } 5.6 \pm 0.1$) of CLEO and CREO were prepared by directly adding EOs in MRS broth (HiMedia) containing Tween 80 (1%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) as an emulsifier, followed by vigorous shaking using a vortex for 5 min. Using this method, the prepared emulsions presented droplet sizes characteristic of macroemulsions (Kale & Deore, 2017; Friedman, Henika, & Mandrell, 2002). At the assayed concentration (1%, v/v), Tween 80 did not present inhibitory effects against the test strains used in the study. Two-fold serial dilutions from the stock emulsion were added to the wells of a 96-well microtiter plate to provide final concentrations of CLEO or CREO in a range of 16 to $0.13 \mu\text{L/mL}$. Then, $50 \mu\text{L}$ of the bacterial suspension prepared in MRS broth was added to each well (resulting in final viable counts of approximately $7 \log \text{CFU/mL}$). Each microplate included positive (inoculated) and negative (non inoculated) controls. The microtiter plates were covered with a lid and incubated anaerobically (ASA) at 37°C for 24 h. The MIC of CLEO or CREO was confirmed as the lowest concentration capable of inhibiting visible bacterial growth (Sousa Guedes et al., 2016). The MIC was defined as the highest concentration to be tested in assays for the determination of sensory thresholds.

Compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT) of CLEO and CREO in fruit juices

All sensory analyses were performed after approval from the Committee on Ethical Research Involving Humans Beings (Federal University of Paraíba, protocol 1.125.993/2015). The rejection threshold (RT) of the CLEO and CREO in the fruit juices and the compromised acceptance threshold (CAT), which indicates the transition point between sensory acceptance and rejection, were assessed using a previously proposed and validated methodology (Lima Filho et al., 2015; 2017). For this, 50 untrained panelists (18 to 58 years old) were preselected according to their interest and frequency of fruit juice consumption. Sensory tests comprised

five sessions of acceptance tests (Stone et al., 2012) performed in individual booths under controlled temperature and light. In each session, the panelists received two samples, one of which was the control sample (fruit juice without CLEO or CREO) and the other was a stimulus sample (fruit juice containing CLEO or CREO at 2, 1, 0.50, 0.25, 0.13 $\mu\text{L/mL}$). Between sessions, the stimulus sample was presented in ascending order of CLEO or CREO concentration, and the position of the stimulus sample within each pair was randomized (Lima Filho et al., 2017). Approximately 30 mL of each juice (with or without CLEO or CREO) were served in white disposable 50-mL cups encoded with a random three-digit number to avoid panelists to know the sample referred as control or stimulus. Panelists judged the samples using a hedonic scale of nine points ranging from 1 (dislike extremely) to 9 (like extremely). A 5 min interval was observed before offering a new pair of fruit juice samples. Between sessions, panelists were invited to use low-salt biscuits and rinse their mouths with drinking water to cleanse their palates. Panelists were allowed to freely select any of the nine points of the hedonic scale that best reflected their judgments.

For the statistical analysis of the data as well as CAT determination in each session, the *t*-test for paired samples was used to compare the hedonic scores of control and stimulus samples. The obtained *t* values (Y1-axis) were graphically evaluated as a function of the EOs concentrations (X-axis). The point that resulted in significant differences ($P \leq 0.05$) between the control and stimulus samples was represented in the graph by a dotted line (tabulated *t* value). To assess the RT of the CLEO or CREO in fruit juices, a second Y axis (Y2-axis) representing the average hedonic score of the stimulus sample was inserted into the graph. The transition point between the sensory acceptance and rejection of the fruit juices was represented on the graph by a dashed line referring to the hedonic score 5 (category “indifferent”) (Della Lucia et al., 2014). To determine the CAT and RT values, the regression models were adjusted to the points of the graph (Y1-axis points= CAT; Y2-axis points= RT). From the model

equation, the CAT was calculated considering where the calculated t value became equal to the standard t value ($P = 0.05$) ($Y1 = \text{tabulated } t \text{ value}$); the RT was calculated considering the point where the average hedonic score for CLEO or CREO concentration became equal to “indifferent” in the hedonic scale ($Y2=5$). The validity of the models generated was determined from the significance of the regression coefficients ($SS_{\text{regression}}/SS_{\text{total}}$).

Inactivation by CLEO or CREO in fruit juices

To assess the inactivation of each test strain in apple or orange juice using CLEO or CREO alone or in combination with MHT, the juices were centrifuged ($12,500 \times g$, 15 min, 4°C) to separate the pulp from the remaining liquid. The supernatants were filtered using a triple-cheesecloth layer and sterilized by autoclaving (121°C , 1.1 atm, for 15 min). The effects of concentrations of CLEO or CREO below the RT on the viable counts of each test strain in the apple and orange juices were assessed for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 min. Initially, an aliquot of 1 mL of the bacterial suspension ($8 \log_{10}$ CFU/mL) was inoculated in 9 mL of juices containing CLEO or CREO at the desired final concentrations prepared as described above. At intervals of 0 (just after homogenization), 2, 4, 6, 8, 10 and 12 min post incubation at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), an aliquot of 100 μL of each mixture was serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL). Subsequently, 20 μL aliquots of each dilution were inoculated onto MRS agar using the microdrop technique (Herigstad, Hamilton, & Heersink, 2001). Control systems without CLEO or CREO were assayed similarly. The plates were incubated anaerobically (ASA) at 37°C for 24 h, and the results were expressed as $\log_{10}$ CFU/mL.

Inactivation by CLEO or CREO in combination with MHT in fruit juices

The effects of CLEO or CREO concentrations below the RT in combination with MHT (54 °C) on the viable counts of each test strain in apple and orange juices were assessed after 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 min of exposure. Initially, aliquots of 9 mL of fruit juice containing CLEO or CREO at different concentrations were placed in a shaking bath with the thermostat set at 54 °C. Once the core point of each fruit juice sample reached 54 °C, an aliquot of 1 mL of bacterial suspension ($8 \log_{10}$ CFU/mL) was added to the flasks. After 0, 2, 4, 6, 8, 10 or 12 min at 54 °C, an aliquot of 100 µL of each fruit juice was serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL), and subsequently, aliquots of 20 µL of each dilution were inoculated onto MRS agar as previously described (Herigstad et al., 2001). Systems without CLEO or CREO were assayed similarly to evaluate the effects of MHT alone. The plates were incubated anaerobically (ASA) at 37 °C for 24 h, and the results were expressed as $\log_{10}$ CFU/mL.

To determine the occurrence of synergism between CLEO or CREO and MHT, the results obtained in combined applications were compared to the corresponding theoretical results, which described the sum of the inactivation caused by CLEO, CREO or MHT acting individually (additive effect). The enhanced effects of CLEO or CLEO and MHT acting simultaneously were considered synergistic effects (Arroyo, Cebrián, Pagán, & Condón, et al., 2012).

Modeling the survival curves of test strains in juices treated with CLEO or CREO in combination with MHT

The obtained survival curves of each test strain in orange or apple juice treated with CLEO or CREO in combination with MHT were fitted to the following the Equation 1 (Mafart, Couvert, Gaillard, & Leguerinel, 2002):

$$\log \frac{N_t}{N_0} = \left(\frac{t}{\delta} \right)^p \quad (\text{Eq. 1})$$

where t is the treatment time (min); N_t and N_0 are the population densities (CFU/mL) at time t and time zero, respectively; and δ and p are two characteristic parameters of the equation. The δ value is the time to the first decimal reduction (the time necessary to inactivate the first $\log_{10}$ cycle of the microbial population). The p value is a shape parameter dependent on the profile of the survival curve: $p < 1$ for concave upwards survival curves, $p = 1$ for linear survival curves, and $p > 1$ for concave downwards survival curves. Once the profile of the survival curves was described by Eq. 1, the time needed to achieve a 3-log reduction (3δ value) was estimated as a function of the CLEO or CREO concentration and juice type evaluated.

Physicochemical parameters of fruit juices

To assess whether the sensorially accepted concentrations of CLEO or CREO used in combination with the MHT affected the physicochemical parameters of apple and orange juices, samples subjected or not to combined treatments were analyzed for soluble solids content (°Brix), pH and titratable acidity (TA) (CLEO or CREO and MHT) using standard procedures (AOAC, 2016). °Brix was determined using a digital refractometer (model HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil) (No. 932.12). pH values were determined using a digital potentiometer (model Q400AS, Quimis, São Paulo, Brazil) (No. 981.12). TA was determined using phenolphthalein as an indicator with 0.1 N NaOH, and the results were expressed in g per 100 mL of citric acid equivalents (No. 942.15).

Statistical analysis and reproducibility

The assays were performed in triplicate in three independent experiments. For the MIC assays, the results were expressed as modal values because the MIC values were the same in all repetitions. For the assays of $\log_{10}$ reduction and physicochemical parameters, statistical

analyses were performed to determine significant differences ($P \leq 0.05$) using ANOVA followed by post hoc Tukey's test or Student's t-test. The error bars in the figures indicate the mean $\pm$ standard deviations from the data obtained from independent experiments. For kinetic analysis of the data, the least-squares criterion by the GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) was used.

Results and discussion

Selection of autochthonous lactic acid bacteria test strains

A total of 40 isolates of lactic acid bacteria, comprising 20 isolates from each type of fruit juice, were selected for identification. Species belonging to the *Lactobacillus* genus were predominant (32/40 isolates) in both juices. The following *Lactobacillus* species were identified in both juices: *L. plantarum* (n=8 in apple juice; n=5 in orange juice), *L. brevis* (n=3 in apple juice; n=7 in orange juice) and *L. fermentum* (n=2 in apple juice; n=7 orange juice). *Leuconostoc mesenteroides* (n=8) was identified only in orange juice.

One strain of *L. plantarum* isolated from apple juice and one strain of *L. brevis* and one strain of *L. mesenteroides* isolated from orange juice were selected as target organisms for this study considering that these species commonly act as juice spoilage bacteria (Espirito-Santo, Carlin, & Renard, 2015; Campos & Cristianini, 2007; Elez-Martínez, Escolà-Hernández, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2005; Basak et al., 2002).

Chemical composition of CLEO and CREO

A total of 23 and 18 constituents were identified in CLEO and CREO used in this study, respectively (Table 1). The constituents detected at the highest amounts in CLEO were limonene (66.47%), β -pinene (11.71%), γ -terpinene (9.29%) and sabinene (2.00%). Other constituents, such as α -pinene (1.91%), myrcene (1.71%) and geranial (1.35%), were detected

in minor amounts. The majority constituent in the CREO was also limonene (89.38%), followed by myrcene (2.05%). Previous studies also reported limonene (53.57–84.73%), β -pinene (8.23–12.74%) and γ -terpinene (3.38–9.66%) as the predominant constituents in CLEO (Espina et al., 2011; AL-Jabri & Hossain, 2018). Similarly, limonene (60.74–80.2%) and myrcene (6.7–7.43%) have been described as the majority constituents in CREO (Tao, Jia, & Zhou, 2014; Fouad & Camara, 2017). Differences in the amounts of limonene detected in CLEO and CREO could be explained by the influence of environmental conditions (e.g., altitude, temperature, rainfall and geographical distribution) on the plant source (AL-Jabri & Hossain, 2018). These findings reinforce the importance of determining the chemical characterization of EOs each time a new study is carried out because this characterization may help to determine the differences among the antimicrobial activities of EOs obtained from the same plant species (Espina et al., 2012).

MIC values of CLEO and CREO

The MICs of both CLEO and CREO against *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* were 2 μ L/mL. The antimicrobial activities of CLEO and CREO has been primarily related to the high amounts of limonene in the composition of these EOs. An earlier study reported strong antimicrobial efficacy of limonene (MIC 1 μ L/mL) against *L. brevis* DSMZ 20054 and *L. plantarum* DSMZ 2601 (Bevilacqua, Corbo, & Sinigaglia, 2010). The hydrophobic characteristics of limonene and other compounds, such as γ -terpinene, terpinolene, linalool and limonene, found in CLEO and CREO could perturb the bacterial cell membrane, increasing its permeability and causing leakage of cellular components (Prashar, Hili, Veness, & Evans, 2003; Tao et al., 2014). Synergistic interactions resulting from disturbing effects of limonene on the bacterial cell membrane that could facilitate the uptake of other constituents

present in smaller amounts in CLEO and CREO (e.g., linalool, octanal and β -ocimene) may also contribute to the antimicrobial activities of these EOs (Espina et al., 2011).

CAT and RT of CLEO and CREO in fruit juices

CLEO and CREO were evaluated in concentrations of 0.13, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.0 $\mu\text{L/mL}$ to determine the CAT and RT in apple and orange juices. Fig. 1 shows the calculated t values (Y1-axis) and the hedonic score (Y2-axis) as a function of CLEO and CREO concentrations in the stimulus fruit juice samples (X-axis). The obtained linear models showed significant regression coefficients ($P \leq 0.05$).

In the orange juice, the CAT of CLEO was 0.17, and the CAT of CREO was 0.15 $\mu\text{L/mL}$. In the same juice, the RT of CLEO and CREO was 0.58 and 0.68 $\mu\text{L/mL}$, respectively. In the apple juice, the CAT of CLEO and CREO was 0.15 and 0.16 $\mu\text{L/mL}$, respectively, while the RT was 0.59 for CLEO and 0.68 $\mu\text{L/mL}$ for CREO. Consequently, apple and orange juices at concentrations of 0.13, 0.25 and 0.50 $\mu\text{L/mL}$ CLEO or CREO were considered acceptable by panelists ($\geq \text{CAT} < \text{RT}$). Analyses of acceptance as a function of the CLEO or CREO concentration based on the angular coefficient of CLEO and CREO in apple juice or orange juice showed that the increase in CLEO or CREO concentration decreased the juice acceptance (Table 2).

The hedonic scores of juices added of CLEO or CREO concentrations referring to their CAT values were “like moderately” (hedonic score 7) or “like very much” (hedonic score 8). Otherwise, the hedonic scores of juices added of CLEO or CREO concentrations corresponding to their RT values were “dislike very much” (hedonic score 2) or “dislike extremely” (hedonic score 1).

A previous study reported the overall acceptance of CLEO at potentially antimicrobial concentrations (20 to 200 $\mu\text{L/L}$) in three distinct matrices (tomato juice, vegetable soup and poultry burgers) (Espina, García-Gonzalo, & Pagán, 2014b). According to these researchers,

only the lowest assayed concentration (20 $\mu\text{L/L}$) of CLEO had acceptance in tomato juice, while higher CLEO concentrations were accepted in vegetable soup (200 $\mu\text{L/L}$) and poultry burgers (100 $\mu\text{L/L}$). These results show that the determination of CLEO and CREO sensory thresholds in the matrix proposed for incorporation results in a successful experimental approach to explore their application because concentrations that exceed the RT, even though they are effective against target bacteria (for example, based on MIC values), would not be applicable.

Inactivation of the test spoilage bacteria by CLEO or CREO in combination with MHT in fruit juices

No decreases ($P > 0.05$) were observed in the counts of *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* after 12 min of exposure to 0.13 $\mu\text{L/mL}$ CLEO or CREO in apple and orange juices (Fig. 2-3). Counts of *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* decreased ($P \leq 0.05$) by approximately 1 $\log_{10}$ CFU/mL after 12 min of exposure to 0.25 $\mu\text{L/mL}$ CLEO in apple and orange juices (Fig. 2). The same concentration of CREO (0.25 $\mu\text{L/mL}$) decreased ($P \leq 0.05$) 1.6 $\log_{10}$ and 1.1 $\log_{10}$ CFU/mL in the counts of *L. mesenteroides* and *L. plantarum*, respectively, in both juices (Fig. 3), but it did not decrease ($P > 0.05$) the counts of *L. brevis* in apple (Fig. 3A1) or orange (Fig. 3A2) juice after 12 min of exposure.

Interestingly, 0.50 $\mu\text{L/mL}$ CLEO decreased ($P \leq 0.05$) 3.5 $\log_{10}$ CFU/mL in the counts of *L. plantarum* in apple juice and only decreased 1.1 $\log_{10}$ CFU/mL in the counts of *L. brevis* and *L. mesenteroides* in the same juice after 12 min of exposure (Fig. 2A1-C1). In orange juice, 0.50 $\mu\text{L/mL}$ CLEO caused decreases ($P \leq 0.05$) of 1.7 $\log_{10}$ CFU/mL in the counts of *L. plantarum*, 1.4 $\log_{10}$ CFU/mL in the counts of *L. brevis* and 1.1 $\log_{10}$ CFU/mL in the counts of *L. mesenteroides* after 12 min of exposure (Fig. 2A2-C2). In apple juice, 0.50 $\mu\text{L/mL}$ CREO decreased the counts of *L. plantarum* and *L. mesenteroides* ($P \leq 0.05$) by 1.5 $\log_{10}$ CFU/mL (Fig. 3B1-C1) and the counts of *L. brevis* by 1 $\log_{10}$ CFU/mL (Fig. 3A1). Comparatively, 0.50

$\mu\text{L/mL}$ CREO decreased ($P \leq 0.05$) the counts of *L. mesenteroides* by approximately $2 \log_{10}$ CFU/mL and the counts of *L. brevis* and *L. plantarum* by $1.2 \log_{10}$ CFU/mL in orange juice after 12 min of exposure (Fig. 3A2-C2).

In combination with MHT, the decrease in the counts of *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* varied with the concentration of CLEO or CREO evaluated and the time of exposure. A decrease ($P \leq 0.05$) of approximately $5 \log_{10}$ CFU/mL was observed in the counts of *L. brevis* after 12 min of exposure to $0.50 \mu\text{L/mL}$ CLEO or CREO in combination with MHT in both apple and orange juices (Fig. 4). Similar results were observed after 8 min of exposure to $0.50 \mu\text{L/mL}$ CREO and MHT in orange juice ($P \leq 0.05$) (Fig. 4D).

As observed in Fig. 4, the level of inactivation of *L. brevis* caused by the experimental combined treatment was higher than that theoretically estimated by the sum of the lethality of both hurdles acting individually (additive effect), indicating the occurrence of a remarkable synergistic effect. The magnitude of the synergism was greater when using CREO in combination with MHT. The use of CREO caused more than 2 extra $\log_{10}$ cycles of inactivation after 4 and 6 min of treatment in apple and orange juices, respectively. Similar results were observed for all concentrations assayed (0.13 , 0.25 and $0.50 \mu\text{L/mL}$) of CLEO or CREO in combination with MHT against *L. plantarum* and *L. mesenteroides* (data not shown). The synergism observed against the test strains was probably a result of an initial sublethal damage in the cell envelopes caused by MHT, which would help the hydrophobic CREO or CLEO constituents (e.g., limonene, β -pinene and myrcene) cross the bacterial membranes and act directly in the cell (Mañas & Pagán, 2005; Espina et al., 2011; Espina et al., 2012).

To assess the resistance of each strain to the combined process, the survival curves were fitted using Eq. 1 (Table 3), which described the survival curve profile obtained after 12 min of exposure to the combined processes, independent of the spoilage bacteria, CLEO or CREO concentration and juice type (apple and orange). The results demonstrate that the δ values

decreased when the EO concentration increased and that p values were less than 1 and varied as a function of the strain and treatment conditions applied. The estimated parameters with their 95% confidence limits are listed in Table 3. The root mean square error ($RMSE$) and determination coefficient (R^2) values indicated the goodness of fit.

Based on the estimated parameters obtained by Equation 1, the time to inactivate 99.9% (3δ value) of the microbial population was estimated. Fig. 5 shows the relationship between the $\log_{10}$ of 3δ values and the concentration of CLEO (Fig. 5A-B) or CREO (Fig. 5C-D) for *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* inactivation under the combined treatment in apple (Fig. 5A-C) and orange (Fig. 5B-D) juices. As observed in Fig. 5, the time to cause 3-log reduction (3δ) in *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* counts decreased ($P \leq 0.05$) when CLEO or CREO concentrations in combination with MHT increased, independent of the exposure time. An earlier study reported that the inactivation rate of *E. coli* O157:H7 in orange juice increased with the increase in *C. sinensis* EO concentration in combination with MHT (54-60 °C) as well as with the time of exposure to the combined treatment (Espina et al., 2014a).

The efficacy of CLEO or CREO concentrations combined with MHT varied between the apple and orange juices. *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* showed high sensitivity ($P \leq 0.05$) to the same CLEO concentrations combined with MHT in orange juice (Fig. 5A-B). These results could be associated with the distinct composition of the juices because the constituents of the food matrices play an important role in bacterial protection against heat (Espina et al., 2014a). Similarly, food matrix components may influence the antimicrobial efficacy of EOs (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2009).

CREO in combination with MHT showed higher efficacy ($P \leq 0.05$) in inhibiting *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* (Fig. 5C-D) than that of CLEO (Fig. 5A-B) in both apple and orange juices. The higher amounts of oxygenated monoterpenes (e.g., octanal, linalool, decanal and α -sinensal) ($P \leq 0.05$) in CREO (7.02%) than in CLEO (4.2%) probably

influenced the antibacterial effects of CREO because both EOs had limonene as the major constituent. The stronger antimicrobial activity exerted by CREO against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 than that exerted by CLEO has already been reported and was putatively associated with the higher proportion of oxygenated monoterpenes in CREO than in CLEO (Espina et al., 2011).

L. mesenteroides was the most susceptible ($P \leq 0.05$) to CREO and MHT in apple and orange juices (Fig. 5C-D) and the most resistant to CLEO and MHT in orange juice (Fig. 5B). Otherwise, *L. brevis* was the most susceptible ($P \leq 0.05$) to CLEO and MHT in orange juice (Fig. 5B) and the most resistant to CREO and MHT in both juices (Fig. 5C-D). The distinct susceptibility of spoilage microorganisms such as *Saccharomyces cerevisiae* (Tyagi, Gottardi, Malik, & Guerzoni, 2013), *Zygosaccharomyces rouxii* and *Z. bailii* to EOs in fruit juices has been reported (Tyagi et al., 2013; Karaman, Sagdic, & Yilmaz, 2016). However, no previous studies have focused on the efficacy of CREO and CLEO applied alone or combined with MHT against autochthonous spoilage bacteria in apple and orange juices.

Apple and orange juices treated with 0.13, 0.25 and 0.50 $\mu\text{L/mL}$ CLEO or CREO and MHT for 12 min presented °Brix in a range of 10.56 to 10.93 (Table 4). The pH of apple and orange juices varied from 3.91 to 4.06, while TA ranged from 0.15 to 1.73 (Table 4). No differences were observed between the physicochemical characteristics of treated and control juices (Table 4). These results are important because they show that sensorially accepted concentrations of CREO or CLEO (0.13, 0.25 or 0.50 $\mu\text{L/mL}$) in combination with MHT (54 °C; 12 min) did not compromise the quality aspects of orange and apple juices that characterize unsweetened fruit juices (Brazilian Legislation, 2016).

Conclusion

The application of doses below the RT of CLEO and CREO was not effective in reducing the counts of *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* in apple and orange juices. However, doses below the RT of CLEO and CREO when applied in combination with MHT were effective in reducing the counts of *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* in the juices up to 5 log₁₀ CFU/mL. The antibacterial efficacy of the combined treatments varied among the strains, EOs and juice type. The magnitude of the synergism was greater when MHT was combined with CREO than with CLEO. These results indicate that the doses of *Citrus* spp. EOs, primarily CREO, below the RT in combination with MHT could serve as an alternative to control autochthonous spoilage bacteria in apple and orange juices. These findings clearly indicate that the determination of sensory limits is critical to determine the potential application of *Citrus* spp. EOs as preservatives in fruit juices.

Acknowledgments

The authors thank CNPq-Brazil (Grant Number 401100/2014-6) for financial support and scholarships awarded to G.T de Souza Pedrosa and R. J. de Carvalho and MINECO Project (No. AGL2015-69565-P) for financial support.

Author Contributions

GTSP, RP and MM designed the research; GTSP and RC conducted the experiments; and GTSP, RP, DB, RC, ELS and analyzed the data and performed the statistical analysis.

References

- Adams, R. P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Almeida, E. T. C., Barbosa, I. M., Tavares, J. F., Barbosa Filho, J. M., Magnani, M., & De Souza, E. L. (2018). Inactivation of spoilage yeasts by *Mentha spicata* L. and *M. x villosa* Huds. essential oils in cashew, guava, mango and pineapple juices. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12.
- AL-Jabri, N. N., & Hossain, M. A. (2018). Chemical composition and antimicrobial potency of locally grown lemon essential oil against selected bacterial strains. *Journal of King Saud University*, 30, 14–20.
- American Public Health (APHA). (2015). Compendium for the microbiological examination of foods. Washington, DC: American Public Health.
- Arroyo, C., Cebrián, G., Pagán, R., & Condón, S. (2012). Synergistic combination of heat and ultrasonic waves under pressure for *Cronobacter sakazakii* inactivation in apple juice. *Food Control*, 25, 342–348.
- Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2016. *Official methods of analysis of official methods of analysis of the association of official analytical chemist*. method n°. 932.12, method n°. 981.12, method n°. 942.15. 20th ed. AOAC International, Washington.r4.
- Basak, S., Ramaswamy, H. S., & Piette, J. P. G. (2002). High-pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 223–231.

- Bevilacqua, A. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2010). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. *Journal of Food Protection*, 73, 888–894.
- Brazilian Legislation, 2001. Ministry of health. National health surveillance agency. Technical regulation on the microbiological standards for foods. RDC Resolution nº. 12, 2 january 2001. (In Portuguese.). Published 2 January 2001. Retrieved from http://portal.anvisa.gov.br/RDC_12_2001.pdf
- Brazilian Legislation, 2016. Ministry of agriculture, livestock and supply. Technical regulation for establishment of identity and general quality parameters of fruits juice. Ordinance number 86, of august 2016. (In Portuguese.). Published 1 september 2016. Retrieved from http://www.agricultura.gov.br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/documentos/01_09-secao-1-portaria-86.pdf.
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C., (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Campos, F. P., & Cristianini, M. (2007). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 226–229.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, CLSI document M07-A10. tenth ed. Clinical and laboratory standards institute, Pennsylvania.
- Della Lucia, S. M., Minim, V. P. R., Silva, C. H. O., Minim, L. A., & Cipriano, P. A. (2014). Use of relative risk test to evaluate the influence of the brand on beer acceptability. *Semina: Ciência. Agrária*, 35, 2267–276.

- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., Lovino, R., Servili, M., & Taticchi, A. (2011). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28, 900–909.
- Elez-Martínez, P., Escolà-Hernández, J., Soliva-Fortuny, R. C., & Martín-Belloso, O. (2005). Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high-intensity pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 22, 311–319.
- Espina L., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2014a). Synergistic effect of orange essential oil or (+)-limonene with heat treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice at lower intensities while maintaining hedonic acceptability. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 471–81.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2014b). Impact of essential oils on the taste acceptance of tomato juice, vegetable soup, or poultry burgers. *Journal of Food Science*, 79, 1575-1583.
- Espina, L., Somolinos, M., Ait Ouazzou, A., Condón, S., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2012). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *International Journal Food Microbiology*, 159, 9–16.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896–902.
- Espirito-Santo, A. P., Carlin, F., & Renard, C. M. G. C. (2015). Apple, grape or orange juice: which one offers the best substrate for lactobacilli growth? - A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. *Food Research International*, 78, 352–360.

- Fouad, H. A., & Camara, C. A. G. (2017). Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 73, 30–36.
- Friedman, M., Henika, P. R., & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 1545-1560.
- Garcia, E. F., Luciano, W., Xavier, D., Costa, W. K. A., Oliveira, K., Franco, O., Moraes, M.,...Souza, E., (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Frontiers in Microbiology*, 30, 7–1371.
- Guerrouja, K., Sánchez-Rubiob, M., Taboada-Rodríguezc, A., Cava-Rodac, R. M., & Marín-Iniestab, F. (2016). Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological qualityof orange juice. *Food and Bioproducts Processing*, 99, 20–28.
- Guo, X. H., Kim, J. M., Nam, H. M., Park, S. Y., & Kim, J. M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multi strain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16, 321–326.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26, 142–150.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal Microbiology, Methods*. 44, 121–129.

- Hu, W., Zhou, L., Xu, Z., Zhang, Y., & Liao, X. (2013). Enzyme inactivation in food processing using high pressure carbon dioxide technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 145-61.
- Jay, S., & Anderson, J. (2001). Fruit juice and related products. In: Moir CJ, andrew-Kabilafkas C, Arnold G, Cox BM, Hocking AD, Jenson I, eds. Spoilage of Processed foods: Causes and Diagnosis. Marrickville: Southwood Press, p. 187-98.
- Karaman, K., Sagdic, O., & Yilmaz, M. T. (2016). Multiple response surface optimization for effects of processing parameters on physicochemical and bioactive properties of apple juice inoculated with *Zygosaccharomyces rouxii* and *Zygosaccharomyces bailii*. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 258–272.
- Kale, S. N., & Deore, S. L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano Emulsion: A Review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8, 39-47.
- Leite, C. J. B., Sousa, J. P., Medeiros, J. A. C., Conceição, M. L., Falcão-Silva, V. S., & Souza, E. L. (2016). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. Essential oil in pineapple juice. *Journal of Food Protection*, 79, 213–219.
- Lima Filho, T., Lucia, S.M.D., Minim, V.P.R., Silva, R.C.S.N., & Minim, L.A. (2017). Validation of the hedonic threshold methodology in determining the compromised acceptance threshold. *Journal of Sensory Studies*, 32, e12255.
- Lima Filho, T., Minim, V. P. R., Silva, R. C. S. N., Lucia, S. M. D., & Minim, L. A. (2015). Methodology for determination of two new sensory thresholds: compromised acceptance threshold and rejection threshold. *Food Research International*, 76, 561–566.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., & Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 107–113.

- Mañas, P., & Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387–1399.
- Prashar, A., Hili, P., Veness, R. G., & Evans, C. S. (2003). Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 63, 569–575.
- Singh, G. M., Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Lim, S., Andrews, K. G., ... Mozaffarian, D., (2015). Global, regional, and national consumption of sugar-sweetened beverages, fruit juices, and milk: a systematic assessment of beverage intake in 187 countries. *PLoS One*, 10, 1–20.
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2018). The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control*, 85, 144–150.
- Sousa Guedes, J. P. S., Medeiros, J. A. C., Silva, R. S. S., Sousa, J. M. B., Conceição, M. L., & Souza, E. L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 183–192.
- Stone, H., Bleibaum, R. N., & Thomas, H. A. (2012). Sensory Evaluation Practices. (4th ed.) Academic Press, New York, 446.
- Tao, N., Jia, L., & Zhou, H. (2014). Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 153, 265–271.
- Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. *Food Chemistry*, 137, 108–114.
- Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. *Clin. Exp. Allergy* 39, 1643–1651. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.

Table 1. Constituents identified by CG-MS in the essential oil from *Citrus lemon* (CLEO) and *Citrus reticulata* (CREO).

Constituents	RI ^a	Percentage area (%)**		Identification ^b
		CLEO	CREO	
2-Hexanone, 3,3-dimethyl	787	0.46	0.45	RI, MS
4-Butoxy-2-butanone	603	0.36	0.35	RI, MS
α -Thujene	927	0.43		RI, MS
α -Pinene	936	1.91	0.58	RI, MS, PC
Cyclopentane, 1-acetyl-1,2-epoxy	947	0.21	0.21	RI, MS
Sabinene	975	2.00	0.70	RI, MS
β -Pinene	981	11.71		RI, MS, PC
Myrcene	990	1.71	2.05	RI, MS
Octanal	1006		0.13	RI, MS
α -Terpinene	1020	0.19		RI, MS
p-Cymene	1028	0.19		RI, MS, PC
Limonene	1033	66.47	89.38	RI, MS, PC
γ -Terpinene	1061	9.29	0.27	RI, MS
Linalool	1102	0.10	0.26	RI, MS, PC
(E)- β -Ocimene	1048	0.10		RI, MS
Terpinolene	1089	0.38		RI, MS
Decanal	1135		0.30	RI, MS
(R)-6-Octenal, 3,7-dimethyl	1155	0.14		RI, MS
(Z)-2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl	1206	0.78		RI, MS
Neryl acetate	1263	0.53		RI, MS
Geranial	1272	1.35		RI, MS
(E)-Caryophyllene	1265	0.23		RI, MS
Geranyl acetate	1285	0.37		RI, MS
β -Bisabolene	1368	0.69		RI, MS
α -cis-Bergamotene	1418	0.41		RI, MS
Butylated hydroxytoluene	1495		0.15	RI, MS
α -Sinensal	1700		0.12	RI, MS
Methyl tetradecanoate	1722		0.27	RI, MS
Hexadecanoic acid, methyl ester	1962		1.40	RI, MS
(E)-9-Octadecenoic acid, methyl ester	2126		1.05	RI, MS
Octadecanoic acid, methyl ester	2169		0.89	RI, MS
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoic Acid, methyl ester	2189		0.44	RI, MS

^a Retention index relative to n-alkanes;

^b RI: Identification by Kovats index (Adams, 2001); MS: Identification by NIST/EPA/NIH; PC: Identification by authentic standards analyzed by mass spectrometry.

Table 2. Adjusted models of compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT) determination of *Citrus lemon* (CLEO) or *Citrus reticulata* (CREO) essential oil in apple and orange juices and their respective coefficients of determination.

Essential oil	Juice	Equation	Model	r^2
CLEO	Apple	2	$Y1 = 81.761x - 10.183$	0.95
		3	$Y2 = -3.643x + 7.1641$	0.79
	Orange	4	$Y1 = 102.19x - 15.63$	0.93
		5	$Y2 = -3.6078x + 7.0776$	0.78
CREO	Apple	6	$Y1 = 57.821x - 7.1036$	0.99
		7	$Y2 = -3.9289x + 7.655$	0.80
	Orange	8	$Y1 = 59.593x - 6.5039$	0.99
		9	$Y2 = -3.9221x + 7.6772$	0.81

Y1: calculated t values; Y2: mean hedonic score; X: concentration of *Citrus lemon* or *Citrus reticulata* essential oil; r^2 : coefficient of determination.

Table 3. p and δ values estimated from the fitting of Equation 1 to experimental data in assays with *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* in apple and orange juices treated with MHT (54 °C for 12 min) and essential oils from *Citrus lemon* (CLEO) and *Citrus reticulata* (CREO).

Juice	Strain	EO*	Concentration ($\mu\text{L/mL}$)	p^{**}	δ^{***}	RMSE	R^2
Apple	<i>L. brevis</i>	CLEO	0.50	0.38 ± 0.12	0.19 ± 0.19	0.39	0.94
			0.25	0.39 ± 0.15	0.27 ± 0.38	0.43	0.92
			0.13	0.43 ± 0.14	0.43 ± 0.42	0.38	0.93
		CREO	0.50	0.54 ± 0.08	0.71 ± 0.32	0.19	0.98
			0.25	0.61 ± 0.11	1.18 ± 0.55	0.22	0.97
			0.13	0.68 ± 0.16	1.89 ± 0.93	0.25	0.96
	<i>L. mesenteroides</i>	CREO	0.50	0.57 ± 0.09	0.26 ± 0.11	0.24	0.97
			0.25	0.51 ± 0.15	0.39 ± 0.36	0.42	0.94
			0.13	0.38 ± 0.11	0.40 ± 0.33	0.17	0.98
		CLEO	0.50	0.42 ± 0.07	0.38 ± 0.22	0.17	0.98
			0.25	0.46 ± 0.05	0.72 ± 0.26	0.10	0.99
			0.13	0.48 ± 0.08	1.19 ± 0.53	0.14	0.98
	<i>L. plantarum</i>	CREO	0.50	0.50 ± 0.10	0.39 ± 0.26	0.33	0.96
			0.25	0.48 ± 0.06	0.43 ± 0.18	0.17	0.99
			0.13	0.48 ± 0.07	0.63 ± 0.29	0.17	0.98
		CLEO	0.50	0.47 ± 0.03	0.55 ± 0.12	0.08	1.00
			0.25	0.52 ± 0.03	0.99 ± 0.17	0.07	1.00
			0.13	0.64 ± 0.03	2.00 ± 0.18	0.04	1.00
Orange	<i>L. brevis</i>	CREO	0.50	0.82 ± 0.17	1.11 ± 0.47	0.23	0.98
			0.25	0.79 ± 0.19	1.40 ± 0.71	0.30	0.97
			0.13	0.71 ± 0.16	1.43 ± 0.76	0.31	0.96
		CLEO	0.50	0.50 ± 0.08	0.53 ± 0.27	0.26	0.96
			0.25	0.59 ± 0.07	0.86 ± 0.28	0.16	0.99
			0.13	0.76 ± 0.13	1.49 ± 0.56	0.24	0.98
	<i>L. mesenteroides</i>	CREO	0.50	0.31 ± 0.17	0.23 ± 0.31	0.96	0.91
			0.25	0.43 ± 0.12	0.51 ± 0.41	0.39	0.94
			0.13	0.34 ± 0.06	0.62 ± 0.28	0.30	0.95
		CLEO	0.50	0.57 ± 0.09	1.08 ± 0.47	0.18	0.98
			0.25	0.66 ± 0.11	1.93 ± 0.64	0.16	0.98
			0.13	0.67 ± 0.09	2.93 ± 0.67	0.10	0.99
	<i>L. plantarum</i>	CREO	0.50	0.25 ± 0.05	0.03 ± 0.03	0.31	0.96
			0.25	0.37 ± 0.08	0.23 ± 0.16	0.29	0.95
			0.13	0.48 ± 0.13	0.78 ± 0.38	0.38	0.94
		CLEO	0.50	0.50 ± 0.05	0.69 ± 0.19	0.18	0.96
			0.25	0.51 ± 0.04	0.83 ± 0.18	0.08	1.00
			0.13	0.52 ± 0.08	1.15 ± 0.46	0.15	0.98

*EO: essential oil; ** p : shape parameter dependent on the profile of the survival curve; *** δ time to the first decimal reduction; RMSE: root mean square error; R^2 : determination coefficient.

Table 4. Physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation; n = 6) of apple and orange juices treated with *Citrus lemon* (CLEO) or *Citrus reticulata* (CREO) essential oil and MHT (54 °C; 12 min).

Juices	EO (μL/mL)	Physicochemical parameters (storage time interval)			
		Total soluble solids (°Brix)	pH	Titrateable acidity (g/100 g)	
Apple	CLEO	0.13	10.82 ±0.11 ^{Aa}	3.92 ±0.02 ^{Aa}	0.15 ±0.03 ^{Aa*}
		0.25	10.83 ±0.09 ^{Aa}	3.93 ±0.02 ^{Aa}	0.16 ±0.06 ^{Aa*}
		0.50	10.81 ±0.13 ^{Aa}	3.92 ±0.05 ^{Aa}	0.16 ±0.07 ^{Aa*}
		Control	10.82 ±0.10 ^{Aa}	3.94 ±0.02 ^{Aa}	0.17 ±0.06 ^{Aa*}
Orange	CLEO	0.13	10.56 ±0.13 ^{Aa}	4.03 ±0.04 ^{Aa}	1.58 ±0.07 ^{Aa**}
		0.25	10.59 ±0.11 ^{Aa}	4.05 ±0.01 ^{Aa}	1.64 ±0.04 ^{Aa**}
		0.50	10.62 ±0.09 ^{Aa}	4.05 ±0.03 ^{Aa}	1.63 ±0.09 ^{Aa**}
		Control	10.61 ±0.12 ^{Aa}	4.06 ±0.03 ^{Aa}	1.68 ±0.03 ^{Aa**}
Apple	CREO	0.13	10.92 ±0.10 ^{Aa}	3.91 ±0.03 ^{Aa}	0.16 ±0.04 ^{Aa*}
		0.25	10.90 ±0.08 ^{Aa}	3.92 ±0.03 ^{Aa}	0.15 ±0.07 ^{Aa*}
		0.50	10.92 ±0.12 ^{Aa}	3.91 ±0.04 ^{Aa}	0.16 ±0.05 ^{Aa*}
		Control	10.93 ±0.11 ^{Aa}	3.95 ±0.01 ^{Aa}	0.16 ±0.08 ^{Aa*}
Orange	CREO	0.13	10.89 ±0.08 ^{Aa}	4.04 ±0.03 ^{Aa}	1.73 ±0.06 ^{Aa**}
		0.25	10.90 ±0.10 ^{Aa}	4.04 ±0.02 ^{Aa}	1.66 ±0.03 ^{Aa**}
		0.50	10.93 ±0.09 ^{Aa}	4.02 ±0.03 ^{Aa}	1.73 ±0.05 ^{Aa**}
		Control	10.92 ±0.11 ^{Aa}	4.03 ±0.04 ^{Aa}	1.69 ±0.02 ^{Aa**}

EO: essential oil; *Total acidity expressed as malic acid (g 100 g) for apple juice; **Relation of solids soluble in brix/ acidity (g/100 g) of citric acid anhydrous for orange juice; Control: fruit juice not subjected to combined treatment (CLEO or CREO and MHT); Different superscript capital letters in the same row indicate significant difference ($P \leq 0.05$), based on Student's t-test; Different superscript small letters in the same column indicate significant difference ($P \leq 0.05$), based on a Tukey test

Figure captions

Fig. 1. Calculated t values (Y1 - axis) and mean hedonic scores (Y2 - axis) in the function of *Citrus lemon* (A, B) or *Citrus reticulata* (C, D) essential oil concentration (X - axis) for apple (A, C) and orange (B, D) juices. The black dashed line represents the tabulated t ($t_{\text{tab}} = 2.01$), and the black circle ($\bullet$) represents the compromised acceptance threshold. The gray dashed line represents a mean hedonic score of 5 and the gray circle ($\circ$) the rejection threshold.

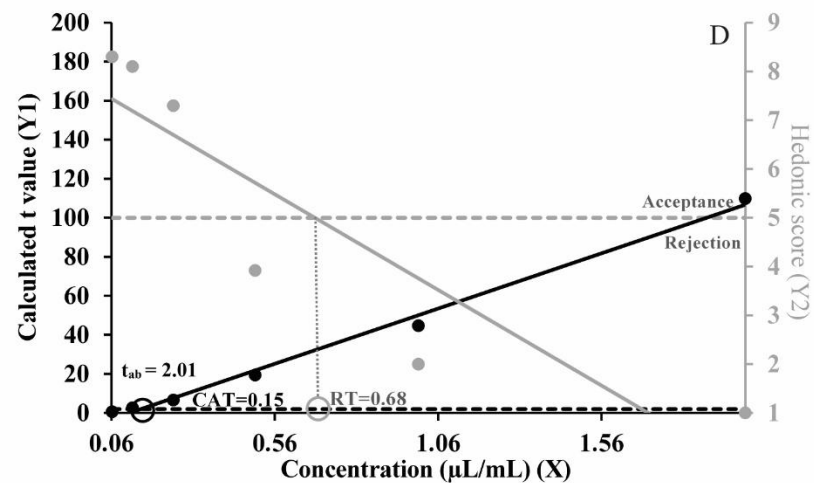
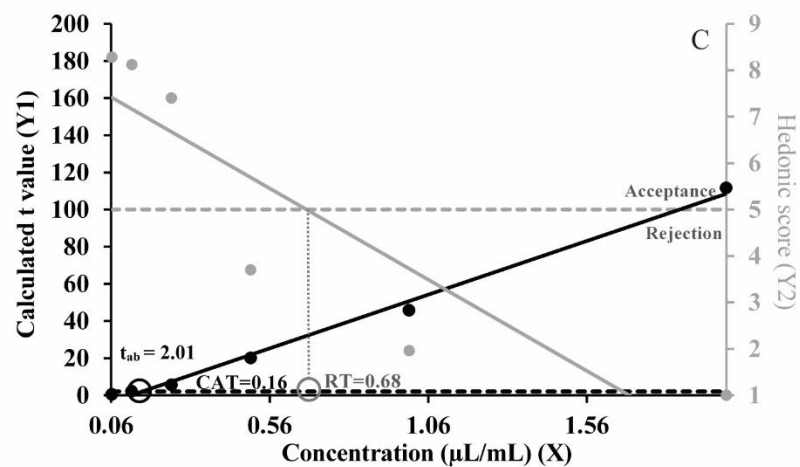
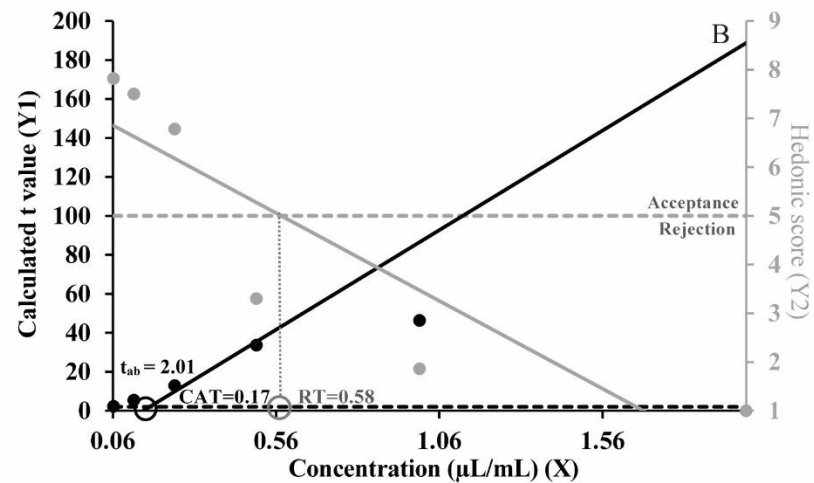
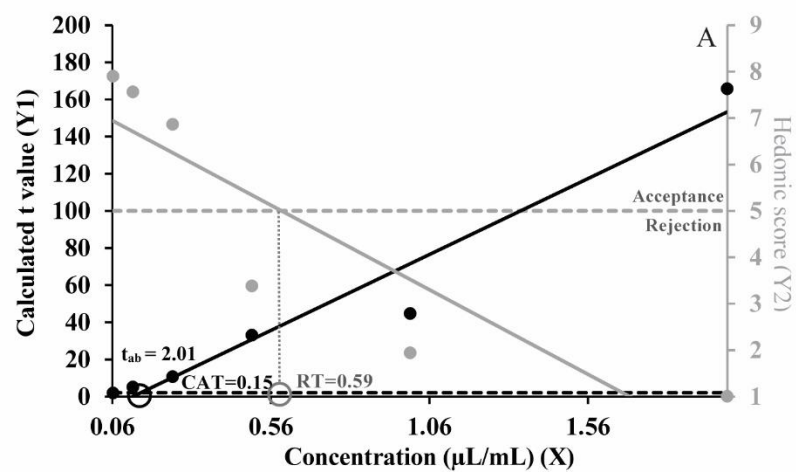


Fig. 2. Log₁₀ cycles of inactivation of *Lactobacillus. brevis* (A), *Lactobacillus plantarum* (B) and *Leuconostoc mesenteroides* (C) in apple (A1-C1) and orange (A2-C2) juices at room temperature as a function of exposure time and *Citrus lemon* essential oil concentration: (●) control: 0 µL/mL; (■) 0.13 µL/mL; (▲) 0.25 µL/mL; (▼) 0.50 µL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments.

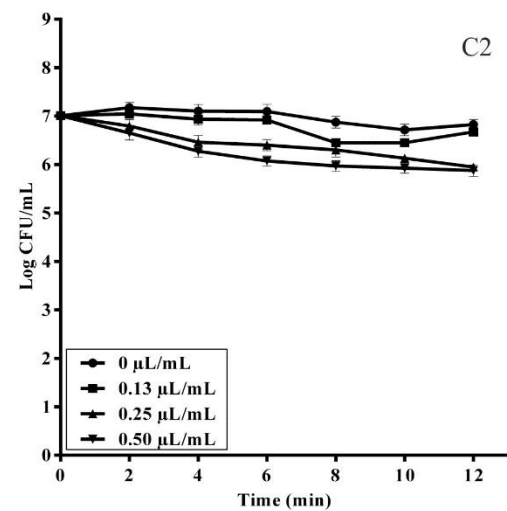
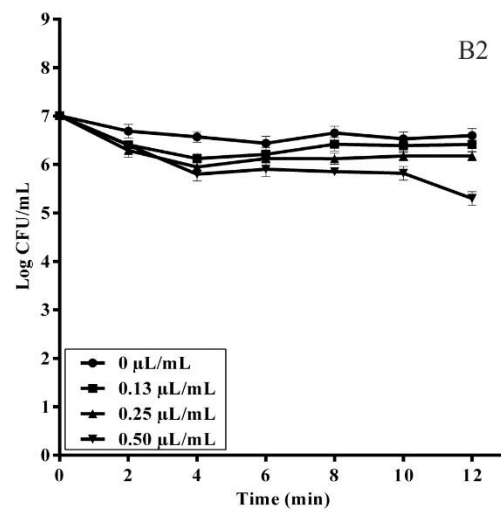
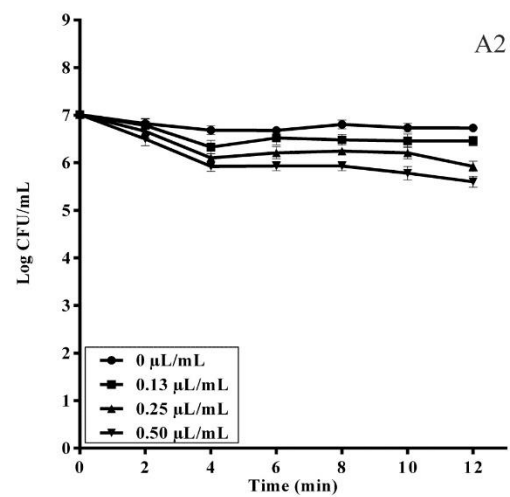
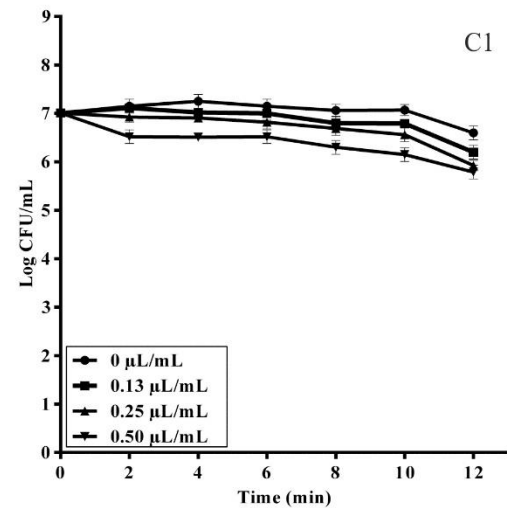
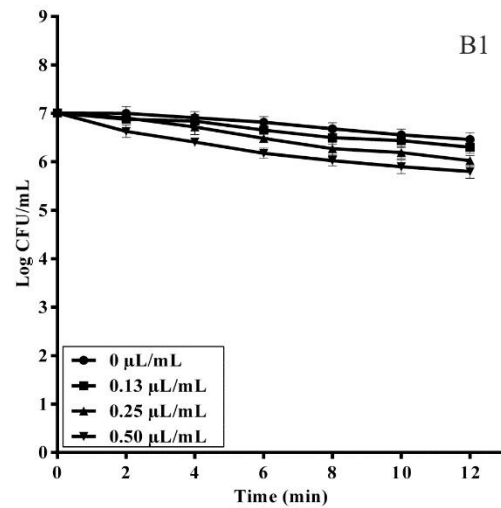
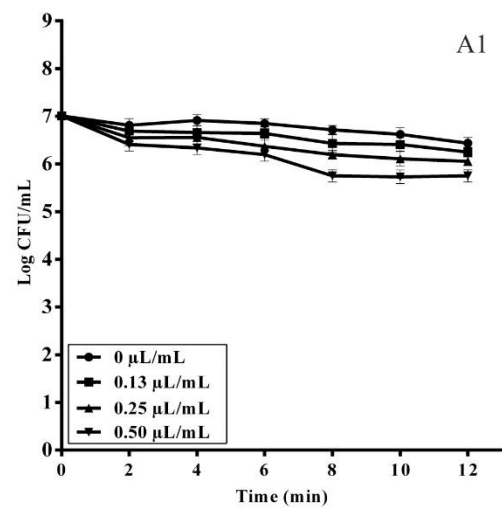


Fig. 3. Log₁₀ cycles of inactivation of *Lactobacillus brevis* (A), *Lactobacillus plantarum* (B) and *Leuconostoc mesenteroides* (C) in apple juice (A1-C1) and orange juice (A2-C2) at room temperature as a function of exposure time and *Citrus reticulata* essential oil concentration: (●) control: 0 µL/mL; (■) 0.13 µL/mL; (▲) 0.25 µL/mL; and (▼) 0.50 µL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments.

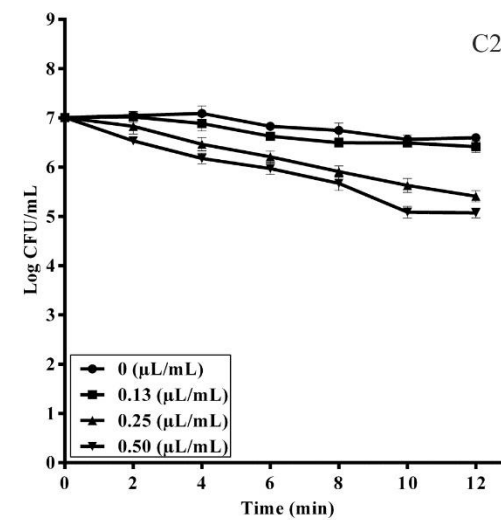
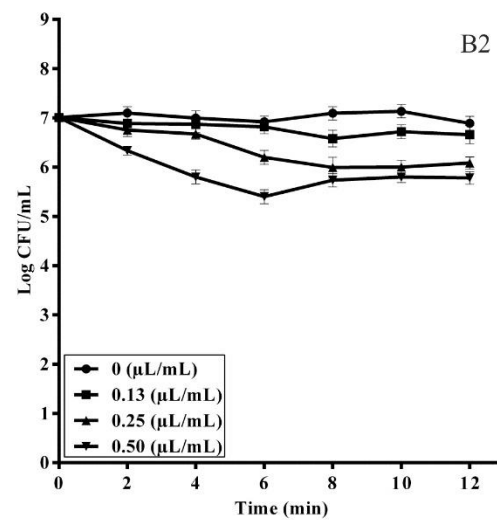
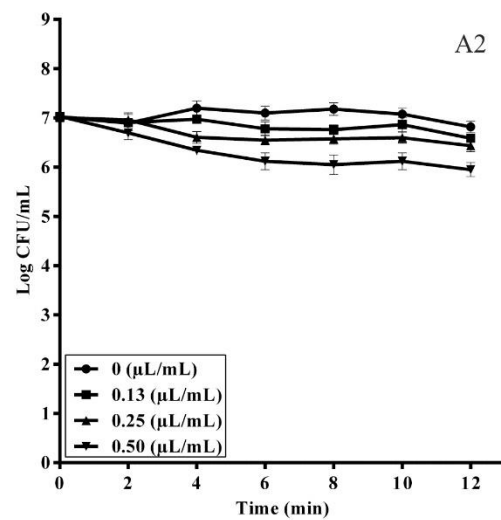
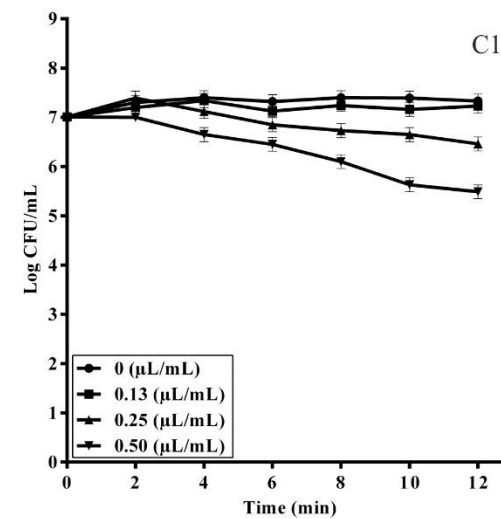
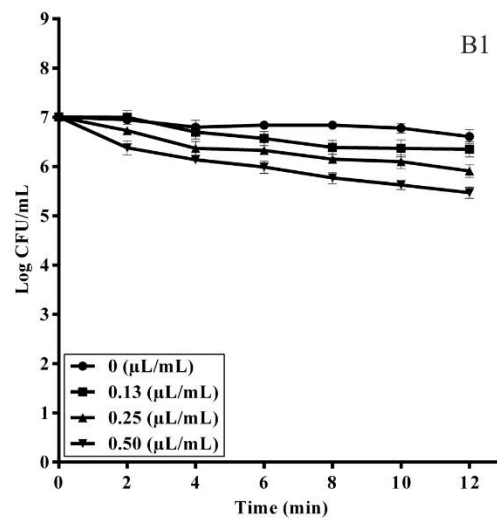
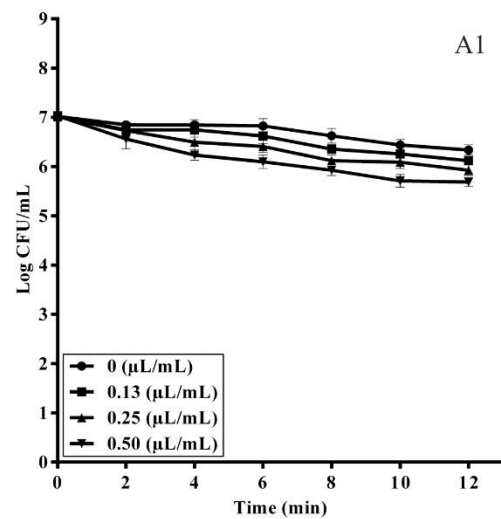


Fig. 4. Survival fraction of *Lactobacillus brevis* after treatment: (●) heated at 54 °C; (■) *Citrus lemon* (A, B) or *Citrus reticulata* (C, D) essential oil applied at 0.50 µL/mL; and (▲) combined treatment (heat treatment (54 °C) in the presence of the EO (0.50 µL/mL) in apple (A, C) and orange (B, D) juices. The figure includes the theoretical inactivation curves obtained by considering the lethality caused by the heat and the EO treatment acting separately (additive effect) (□) and the fitting of Equation 1 to the survival curves obtained after the combined treatments. Data represent the mean ± standard error of the mean (error bars) of at least three independent experiments.

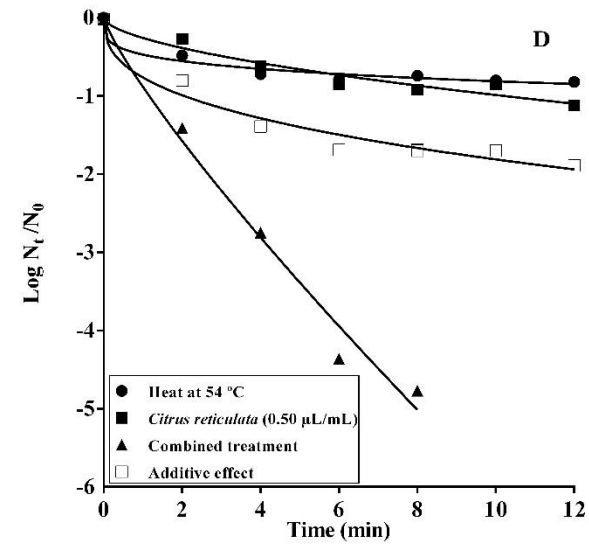
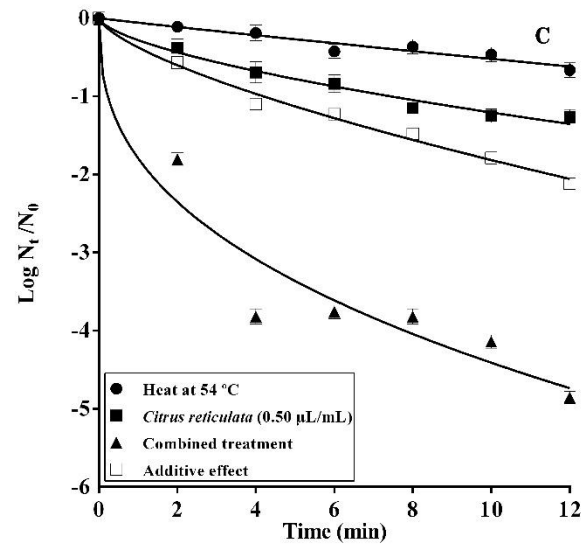
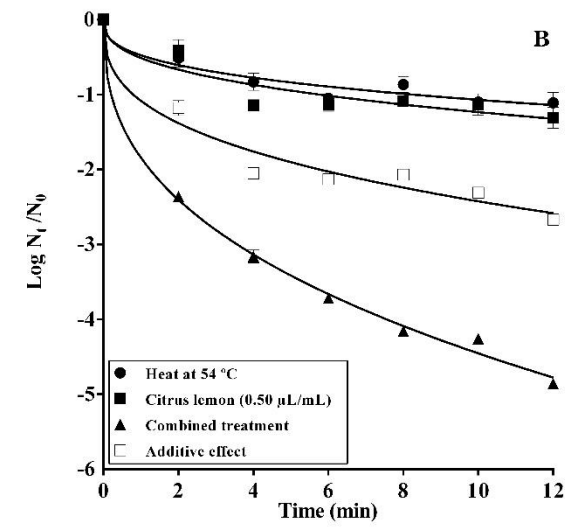
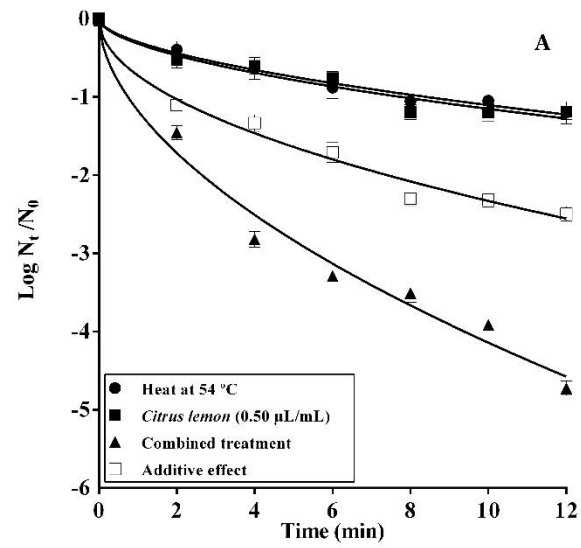
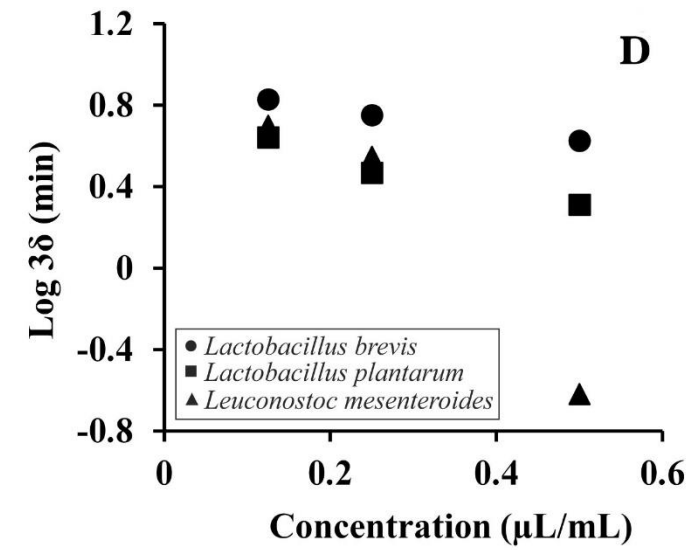
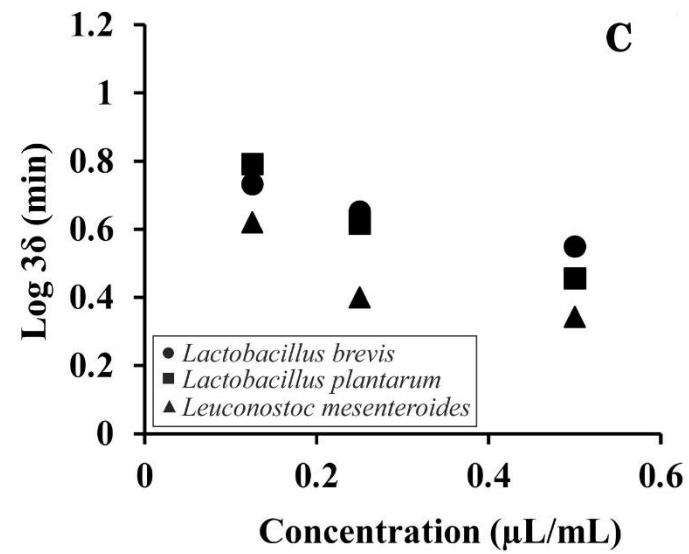
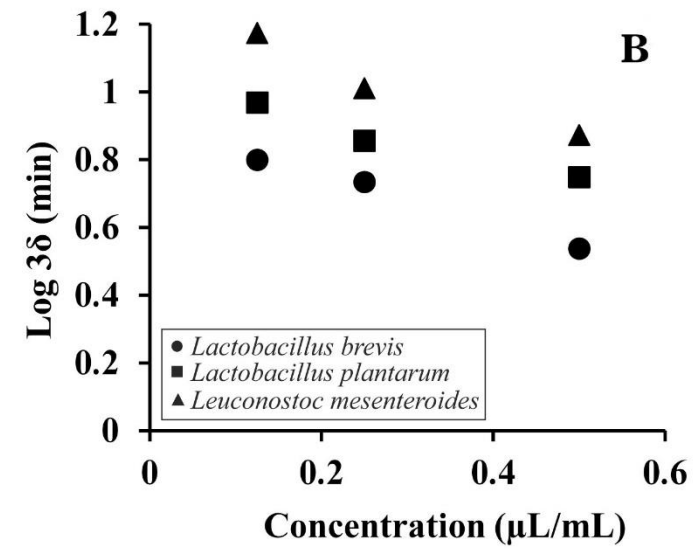
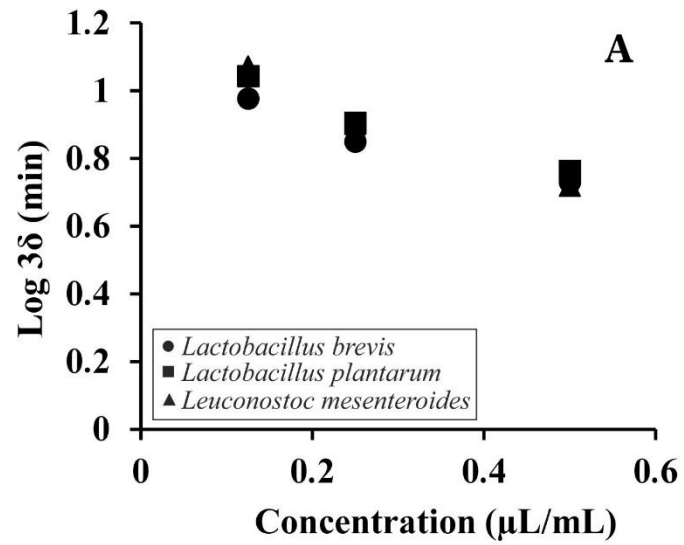


Fig. 5. Relationship between the EO concentration and the log of 3δ values of *Lactobacillus brevis* (●), *Lactobacillus plantarum* (■) and *Leuconostoc mesenteroides* (▲) in apple (A, C) and orange (B, D) juices and heat treated at 54 °C in the presence of *Citrus lemon* (A, B) and *Citrus reticulata* (C, D) essential oils.



5.2 ARTIGO 2: Effects of *Citrus lemon* and *C. reticulata* essential oils in combination with mild heat treatment on physiological functions of autochthonous spoilage bacteria in orange juice

(Artigo submetido ao periódico International Journal of Food Microbiology, Fator de Impacto 4,006)

Effects of *Citrus lemon* and *C. reticulata* essential oils in combination with mild heat treatment on physiological functions of autochthonous spoilage bacteria in orange juice

Running title: Cell damage caused by combined treatments

Geany Targino de Souza Pedrosa¹, Adma Nadja Ferreira de Melo¹, Erika Tayse da Cruz Almeida², Jossana Pereira de Sousa Guedes², Rayssa Julliane de Carvalho¹, Evandro Leite de Souza², Rafael Pagán³, Marciane Magnani^{1*}

¹ *Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

² *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

³ *Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, Spain*

*Corresponding author:

Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Brazil. E-mail: magnani@gmail.com; phone number: +55 83 3216 7576; fax number: +55 83 3216 7354

Abstract

This study investigated the effects of *Citrus lemon* (CLEO) and *C. reticulata* essential oil (CREO) alone and combined with mild heat treatment (MHT) on physiological functions of autochthonous spoilage bacteria *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in orange juice. Cell damage, membrane integrity, membrane potential, respiratory activity, and efflux activity were assessed by flow cytometry analysis after 6 and 12 min of exposure to CLEO or CREO (0.50 µL/mL) and/or MHT (54 °C). The extension of damage on physiological functions varied between CLEO and CREO, the tested strains and depended on the exposure time. CREO alone or combined with MHT caused permeabilisation, depolarisation and compromised the respiratory and efflux activity in a percentage cells of *L. mesenteroides* than *L. brevis* cells, while the opposite was observed for CLEO. The highest percentage (up to 99%) of cells permeabilised, depolarised and with compromised respiratory and efflux activity were always observed in combined treatments, regardless the time of exposure or strain tested. The results of this study showed that CLEO and CREO alone and in combination with MHT inactivate cells of *L. brevis* and *L. mesenteroides* in orange juice through a multi-target mechanism which disrupts the membrane integrity, increasing permeability and decreasing polarization of cells, while compromise the respiratory and efflux activity in orange juice. These findings indicate the combined treatment of CLEO or CREO with MHT as an alternative to control autochthonous spoilage bacteria in orange juice.

Keywords: *Citrus* essential oils, fruit juices, lactic acid bacteria, sublethal injury, cell damage, flow cytometry.

1. Introduction

Orange juice is the most consumed fruit juice in the world with a growing market share. Brazil is the largest producer of orange juice in the world, exporting more than 1,400 tons only in 2017 (CitrusBr, 2018). Orange juice is highly appreciated because its contents of bioactive compounds (e.

g. antioxidants, phenolic compounds, folic acid, and vitamin C) and sensory properties, (Paravisini and Peterson, 2019; Prado et al., 2019).

Lactobacillus spp. and *Leuconostoc* spp. are common genera of the lactic acid bacteria population found in raw fruits (Di Cagno et al., 2011) which are easily transferred to juices (Souza Pedrosa et al., 2019). Species of these genera produce metabolic end-products such as organic acids, diacetyl, CO₂ and ethanol that generate off-flavor and off-odor in orange juice compromising the quality of the final product (Guerrouja et al., 2016; Snyder and Worobo, 2018). The inactivation of spoilage bacteria in orange juice is generally achieved by high temperature (72 to 82 °C for 0.3 to 15 s). These heat treatments destroy heat-sensitive nutrients such as vitamins and compromise the desired freshness in the final product (Petruzzi et al., 2017; Carrillo et al., 2018).

Essential oils (EOs) obtained from *Citrus lemon* (CLEO) and *C. reticulata* (CREO) have been proposed as agents to preserve orange juice because of their antimicrobial activity (Espina et al., 2014; Souza Pedrosa et al., 2019). These substances are generally recognized as safe (GRAS) for use in beverages (U.S. Code of Federal Regulations 8008-56-8 for CLEO and 8016-85-1 for CREO). However, concentrations of CLEO or CREO required to achieve the antimicrobial efficacy may exceed the rejection threshold of consumers (Souza Pedrosa et al., 2019).

The combined use of CLEO and CREO with mild heat treatment (MHT) has been suggested as an alternative to reduce the effective concentration of the essential oil and the temperature applied (Souza et al., 2016). In our previous study we have observed that sensory accepted concentrations of CLEO or CREO in combination with MHT (54 °C) acted in synergism on inactivation of autochthonous *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. mesenteroides* in orange juice. Moreover, the combined treatments did not compromise the quality parameters of orange juice during storage (Souza Pedrosa et al., 2019). Despite the proposed synergistic action of combined *Citrus* spp. EOs and MHT on cell membranes, the damage on physiological functions underlying the bacterial inactivation caused by CLEO or CREO alone or in combination with MHT remains unknown. The use of flow cytometry (FC) coupled with specific fluorescent dyes permits a fast and reliable detection of microbial

physiological status and evidence possible functional and structural changes following exposure to one or more antimicrobial treatments or inactivation processes (Ferrario and Guerrero, 2017; Zhang et al., 2018).

Therefore, the possible mechanisms underlying the inactivation of spoilage bacteria caused by a sensory accepted concentration of CLEO or CREO alone and combined with MHT in orange juice were investigated through the measurement of damage in different physiological functions of autochthonous *L. brevis* and *L. mesenteroides* using FC.

2. Materials and methods

2.1 Test strains and inoculum preparation

L. brevis and *L. mesenteroides* (SisGen number A1DAF63) isolated from fresh orange juice (Souza Pedrosa et al., 2019) were selected as target organisms considering that these species commonly act as juice spoilage bacteria (Basak et al., 2002; Elez-Martínez et. al, 2005).

Stock cultures were maintained in cryovials with De Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Himedia, India) broth containing glycerol (15 g/100 mL) at -80 °C. Each inoculum was obtained from overnight cultures grown anaerobically (Anaerogen, Oxoid) in MRS broth at 37 °C for 18 h to reach the stationary growth phase. Cells were harvested by centrifugation (4500 g x 15 min, 4 °C), washed twice and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS; 8.0 g/L NaCl, 0.20 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 0.24 g/L KH₂PO₄, pH 7.4) to obtain standard cell suspensions with an optical density (OD) at 625 nm (OD₆₂₅) of 0.8. These suspensions provided viable counts of approximately 8 log₁₀ colony forming units per milliliter (CFU/mL) for all strains.

2.2 CLEO, CREO and MHT

CLEO and CREO were purchased from Indulleida S.A. (Lleida, Spain). Limonene was previously identified as major constituent in both, CLEO (66.47%) and CREO (89.38%) (Souza Pedrosa et al., 2019). The concentration 0.50 µL/mL of CLEO or CREO and temperature of 54 °C

were selected for study because when applied in combination decreased approximately 5 log₁₀ CFU/mL of *L. brevis* and *L. mesenteroides* after 12 min of exposure in orange juice (Souza Pedrosa et al., 2019). To assess possible effects of exposure time analysis were performed analyses at zero, 6 and 12 min of treatments (CLEO or CREO and/or MHT).

2.3 Preparation of orange juice

Orange (*Citrus sinensis*) fruits selected for form, color, uniformity in size, appearance and absence of mechanical injuries and visible signs of infection were purchased from a local wholesale distributor (João Pessoa, Brazil). Fruits were surface-disinfected by a 5-min immersion in a sodium hypochlorite solution (0.15 µL/mL, pH 7.2), washed with sterile distilled water and dried in a biosafety cabinet for 30 min.

Orange juice was prepared using a domestic squeezer, followed by centrifugation at 12,500 x g, for 15 min, 4 °C to separate the liquid from the pulp. Subsequently, the supernatants were filtered using a triple-cheesecloth layer and sterilized by autoclaving (121 °C, 1.1 atm, for 15 min) (Sousa Guedes et al. 2016). Juice samples were always prepared in the same day of analyses or maintained under refrigeration (4 ± 0.5 °C) for maximum of 24 h.

2.4 Exposure of test strains to CLEO or CREO and/or MHT

Aliquots of 9 mL of orange juice were placed in a shaking bath with the thermostat set at 54 °C. Once the core point of the juice reached 54 °C, the CLEO or CREO was added in amounts enough to provide the required final concentration (i.e., 0.50 µL/mL). Subsequently, an aliquot of 1 mL of bacterial suspension was added to the flasks (final counts of approximately 7 log₁₀ CFU/mL). After 6 and 12 min at 54 °C, cells were collected by centrifugation (4,500 x g, 10 min, 4 °C), washed twice, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS; 8.0 g/L NaCl, 0.20 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 0.24 g/L KH₂PO₄, pH 7.4) and immediately labeled with fluorochromes to assess different physiological functions. To assess the effects of CLEO or CREO alone on *L. brevis* and *L.*

mesenteroides cells in orange juice, the same procedures were performed at room temperature (25 ± 1 °C) without application of MHT, while for evaluation of effects of MHT alone, the same procedures were performed without addition of CREO or CLEO. Ethanol-treated cells at 70% v/v were always assayed similarly and considered the positive control of the experiment (Silva et al., 2010).

2.5 Staining procedure

2.5.1 Membrane integrity

The double-staining with thiazole orange (TO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to evaluate DNA damage and membrane integrity, respectively. TO is a cell-permeant DNA dye, used to identify DNA-containing particles that can enter in intact and damaged cells and PI is an impermeant DNA dye that enters only damaged membrane cells, intercalates RNA and DNA and binds to nucleic acids (Comas-Riu and Rius, 2009). The dual-staining was performed by incubation of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells (treated with CLEO or CREO and/or MHT) suspended in PBS with TO (1 µg/mL) and PI (1 µg/mL) for 5 min at 37 °C in the dark (Silva et al., 2011).

2.5.2 Membrane potential

The double-staining with bis-1,3-dibutylbarbituric acid (BOX, Molecular Probes, Invitrogen, part of Life Technologies, Eugene, OR, USA) and PI was to assess the membrane potential and membrane damage, respectively. BOX is a fluorescent marker capable of indicating modifications in the membrane potential, being accumulated by depolarized cells or excluded by polarized cells (Silva et al., 2011). The dual-staining was performed by incubation of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells (treated with CLEO or CREO and/or MHT) suspended in PBS with 4 mM EDTA, BOX (2.5 mg/mL) and PI (1 µg/mL) for 5 min at 37 °C (Silva et al., 2011).

2.5.3 Respiratory activity

The respiratory activity in of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells treated with CREO or CREO and/or MHT was assessed using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC, Polysciences, Warrington, PA, USA). CTC is reduced by the respiratory electron transport chain to an insoluble fluorescent formazan which indicate respiratory activity. Respiratory-active cells accumulate the fluorescent CTC-formazan particles, while respiratory-inactive cells did not. For this, *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells suspended in PBS with 1% (w/v) glucose (treated with CLEO or CREO and/or MHT) were mixed with 5 mM CTC and incubated at 37 °C for 30 min (Silva et al., 2011).

2.5.4 Efflux activity

Ethidium bromide (EB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a membrane-permeant was used to measure efflux activity. EB enters intact cell membranes, but is actively pumped out of the cell via a non-specific proton anti-port transport system. In cells with compromised membrane and altered efflux pump activity, the EB binds to the intracellular DNA (Díaz et al., 2010). The staining procedures were performed by incubation of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells (treated with CLEO or CREO and/or MHT) suspended in PBS (1% glucose; w/v) with EB (5 µg/mL) for 5 min at 37 °C (Silva et al., 2011).

2.6 FC analyses

After each staining the exposure period, cell suspensions were centrifuged (4500 g × 10 min, 4 °C) and washed by centrifugation with the equal volume of PBS to remove excess dye (Kim et al, 2017). The obtained cell pellets were resuspended in PBS and analyzed using a flow cytometer equipped with an argon-ion laser emitting at 488 nm (BD Accuri C6, New Jersey, USA). Channels FL1 (533 nm ± 30 nm) and FL3 (> 670 nm) collected the green and red fluorescence, respectively. Scatter and fluorescence (pulse area measurements) signals of individual cells passing through the laser zone were collected as logarithmic signals. FL1 (TO and BOX) and FL3 (PI, EB and CTC) bandpass filters collected the fluorescence signal. Thresholds level for data acquisition was set on for

FSC (10,000) to eliminate noise or particles (of cellular debris) considered much smaller than intact cells. FSC/SSC parameters delimited the bacterial cells. Each sample acquisition was operated at the low flow rate setting and a total of 10,000 events were analyzed.

2.7 FC data analysis

Density plots indicating forward scatter light (FSC) vs. side scatter light (SSC) were obtained along measurements. FSC gave relative information on cell size and was analyzed in the plane of the beam. SSC provided information about cell granularity and was measured at 90° to the laser beam. Density plot analysis of FL1 vs. FL3 were applied to determine the fluorescence properties of the cells.

For the dual-staining TO-PI, cells were characterized as follow TO+ PI+ (gate upper right; UR) correspond to damaged and permeabilised cells; TO- PI- (gate lower left; LL) may indicate damage of DNA or RNA, while the cell membrane may still be intact; TO+ PI- (gate upper left; UL) correspond to cells with intact membranes, and TO- PI+ (gate lower right; LR) correspond to permeabilised cells (Surowsky et al., 2014). For the dual staining with BOX-PI, cells were characterized as BOX- PI- (gate LL) correspond to polarized and non-permeabilised cells; BOX+ PI- (gate UL) correspond to depolarized and non-permeabilised cells; BOX+ PI+ (gate UR) correspond to depolarized and permeabilised cells, and BOX- PI+ (gate LR) correspond to polarized permeabilised cells (Hammer and Heel, 2012).

Density plot analysis of SSC vs. FL3 were applied to determine the fluorescence properties of cells CTC+ and EB+ which represent cells with non-impaired respiratory function and altered efflux pump activity, respectively (Léonard et al., 2016; Morishige et al., 2015). These cells were gated in the right rectangles. All FC analyses were performed in two independent experiments in triplicate with consistent results data analysis was performed using BD Accuri C6 Software (BD®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

3. Results

Fluorescence density plot of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells exposed to the CLEO or CREO and/or MHT in orange juice corresponding to dual-staining with TO and PI demonstrated different magnitude of membrane damage. The percentages of cells are presented in the four edges of each plot (Fig. 1).

After 6 min of exposure to CLEO in orange juice, approximately 11% of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells corresponded to damaged cells with permeabilised membrane (Fig. 1B and 1N); this percentage increased around three times (>30%) after 12 min of exposure to CLEO (Fig. 1H and 1T). In assays with CREO, after 6 min of exposure, 8.2% of *L. brevis* cells corresponded to damaged cells with permeabilised membrane. An increase of this percentage of cells to 23.8% was observed after 12 min of exposure (Fig. 1C and 1I). Otherwise, 21.2% of *L. mesenteroides* cells were damaged and permeabilised after 6 min of exposure to CREO in orange juice and this percentage doubled after 12 min of exposure (Fig. 1O and 1U).

When *L. brevis* cells were exposed to MHT, the percentage of damaged cells with permeabilised membrane was 11.8% and 25.9% after 6 and 12 min of exposure, respectively (Fig. 1D and 1J). In another hand, 23.8% and 40.6% of *L. mesenteroides* cells were damaged and permeabilised after exposure to MHT (Fig. 1P and 1V).

After 6 min of exposure to CLEO and MHT, approximately 69% of *L. brevis* cells were damaged and permeabilised; this percentage of cells increased to 97.6% after 12 min of exposure (Fig. 1E and 1K). In assays with CLEO and MHT, after 6 min and 12 min of exposure, approximately 63% and 83% of *L. mesenteroides* cells were damaged and permeabilised, respectively (Fig. 1Q and 1W). Interestingly, when *L. brevis* cells were exposed to CREO and MHT for 6 min, the population corresponded to damaged cells with permeabilised membrane (~37%) was lower than in assays with CLEO and MHT. However, after 12 min of exposure to CREO and MHT, the percentage of damaged cells with permeabilised membrane increased to approximately 84% (Fig. 1F and 1L). Otherwise, when *L. mesenteroides* cells were exposed to CREO and MHT for 6 min, the percentage of damaged

cells with presented permeabilised was 76.6%; this percentage increased to 98.8% after 12 min of exposure (Fig. 1R and 1X).

Using dual parameter density plots of fluorescence (y-axis; BOX; x-axis: PI), it was possible to monitor *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells that accumulated and retained BOX and PI as indicators of membrane potential and damage, respectively, after exposure to the CLEO or CREO and/or MHT in orange juice (Fig. 2).

After 6 and 12 min of exposure to CLEO, 20.0% and 36.3% of *L. brevis* cells presented depolarized and permeabilised membrane, respectively (Fig. 2B and 2H). Otherwise, only 9.0% of *L. mesenteroides* cells were depolarized and permeabilised after 6 min of exposure to CLEO reaching to 25.3% after 12 min of exposure (Fig. 2N and 2T). Approximately 10% and 26% of *L. brevis* cells were depolarized and permeabilised (Fig. 2C and 2I) after 6 and 12 min of exposure to CREO, respectively. For *L. mesenteroides*, the percentages of depolarized and permeabilised cells after 6 and 12 min of exposure to CREO were 19% and 35%, respectively (Fig. 2O and 2U).

When *L. brevis* cells were exposed to MHT, 13% and ~32% of cells displayed depolarized and permeabilised membrane after 6 and 12 min of exposure, respectively (Fig. 2D and 2J). Otherwise, in assays with *L. mesenteroides*, after 6 and 12 min of exposure to MHT, approximately 21% and 39% of cells were depolarized and permeabilised, respectively (Fig. 2P and 2V).

In another hand, the exposure to CLEO and MHT depolarized and permeabilised approximately 61% of *L. brevis* cells after 6 min of exposure, and this percentage reached to ~99% after longer time of exposure (12 min) (Fig. 2E and 2K). When *L. mesenteroides* cells were exposed to CLEO and MHT, the percentage of depolarized and permeabilised cells was approximately 60% and 91% after 6 and 12 min of exposure, respectively (Fig. 2Q and 2W). Otherwise, CREO and MHT depolarized and permeabilised 56.4% of *L. brevis* cells after 6 min of exposure; this percentage increased to 83.4% after 12 min of exposure (Fig. 2F and 2L). Interestingly, after 6 min of exposure to CREO and MHT, 88.9% of *L. mesenteroides* cells were depolarized and permeabilised and after 12 min of exposure this percentage corresponded to ~99% of the cells (Fig. 2R and 2X).

Fluorescence density plot of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells exposed to the CLEO or CREO and/or MHT in orange juice indicating a cell shift from the left gate (cells with compromised respiratory activity) to the right gate (cells with respiratory activity) in varied levels (Fig. 3).

Approximately 48% of *L. brevis* cells presented compromised respiratory activity after 6 min of exposure to CLEO and this percentage increase to 77% after 12 min of exposure (Fig. 3B and 3H). Otherwise, after 6 min of exposure to CLEO, only 14.8% of *L. mesenteroides* cells presented compromised respiratory activity; this percentage changed to 36.6% when the exposure time increased to 12 min (Fig. 3N and 3T). When cells of *L. brevis* were exposed to CREO, after 6 and 12 min, 31.2% and 58% of cells presented compromised respiratory activity, respectively (Fig. 3C and 3I). In another hand, 6 min of exposure to CREO compromised the respiratory activity in ~30% of *L. mesenteroides* cells. After 12 min of exposure to CREO the percentage of *L. mesenteroides* cells with compromised respiratory activity increased to 68.7% (Fig. 3O and 3U).

After 6 and 12 min of exposure to MHT, 2.9% and 19.6 % of *L. brevis* cells presented compromised respiratory activity (Fig. 3D and 3J). In assays with *L. mesenteroides*, 3.7% and 27.6% of cells showed compromised respiratory activity, after 6 and 12 min of exposure to MHT, respectively (Fig. 3P and 3V).

CLEO and MHT compromised the respiratory activity in 71.4% of *L. brevis* cells after 6 min of exposure and this percentage increased to 97.3% after longer exposure time (Fig. 3E and 3K). When *L. mesenteroides* cells were exposed to CLEO and MHT, 67.1% and 82.8% of cells displayed compromised respiratory activity after 6 and 12 min, respectively (Fig. 3Q and 3W). Otherwise, the exposure to CREO and MHT compromised the respiratory activity in 52.1% and 81% of *L. brevis* cells after 6 and 12 min, respectively (Fig. 3F and 3L). After these same exposure times to CREO and MHT, approximately 73% and 93% of *L. mesenteroides* cells displayed compromised respiratory activity (Fig. 3R and 3X).

Fluorescence density plot of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells exposed to the CLEO or CREO and/or MHT in orange juice indicating a cell shift from the left gate (cells with efflux activity) to the right gate (cells with compromised efflux activity) in varied levels (Fig. 4).

When *L. brevis* cells were exposed to CLEO for 6 and 12 min, approximately 16% and 67% of cells presented compromised efflux activity, respectively (Fig. 4B and 4H). Otherwise, approximately 12% and 36% of *L. mesenteroides* cells displayed compromised efflux activity after 6 and 12 min of exposure to CLEO, respectively (Fig. 4N and 4T). In assays with CREO, approximately 10% and 37% of *L. brevis* cells showed compromised efflux activity after 6 and 12 min of exposure, respectively (Fig. 4C and 4I). In another hand, higher percentage of *L. mesenteroides* cells with compromised the efflux activity were observed after 6 and 12 min of exposure to CREO (24.4% and ~47%, respectively) (Fig. 4O and 4U).

The exposure to MHT for 6 and 12 min compromised the efflux activity of 10.1% and 17.4 % *L. brevis* cells, respectively (Fig. 4D and 4J). When *L. mesenteroides* was exposed to MHT, 14.2% and 23.8% of cells presented compromised efflux activity after 6 and 12 min of exposed, respectively (Fig. 4P and 4V).

The exposure to CLEO and MHT compromised the efflux activity in approximately 69% of *L. brevis* cells after 6 min; this percentage increased to ~99% longer time of exposure (12 min) (Fig. 4E and 4K). Otherwise, approximately 48% and 86% of *L. mesenteroides* cells presented compromised efflux activity after 6 and 12 min of exposure to CLEO and MHT, respectively (Fig. 4Q and 4W). Similar results were observed in *L. brevis* cells after 6 min (~50%) and 12 min (~84%) of exposure to CREO and MHT (Fig. 4F and 4L), while exposure to CREO and MHT for 6 and 12 min compromised the efflux activity in approximately 69% and 98% of *L. mesenteroides* cells, respectively (Fig. 4R and 4X).

L. brevis and *L. mesenteroides* cells in orange juice cells without CLEO or CREO and/or MHT (control) presented a steady population (> 95%) of polarised cells with intact membrane, efflux activity and respiratory activity over the exposure time assessed (Fig. 1-4A, 1-4G, 1-4M and 1-4S).

4. Discussion

The effects of CLEO or CREO and/or MHT on permeabilisation, depolarization and compromised the respiratory and efflux activity varied between the strains tested and increased after longer time of exposure.

The amounts of oxygenated monoterpenes in EOs has been described as a characteristic that influence the antimicrobial effects (Espina et al., 2011). In the present study, the stronger effect of CREO against *L. mesenteroides* compared to *L. brevis* could be attributed to the higher amounts of oxygenated monoterpenes (e.g., octanal, linalool, decanal and α -sinensal) in CREO (7.02%) than in CLEO (4.2%), since both limonene (> 67%) is the major constituent in both (Souza Pedrosa et al., 2019). However, CLEO caused higher permeabilisation and depolarization against *L. brevis*, suggesting influence of strain specific features on the observed results.

The distinct susceptibility of *L. brevis* and *L. mesenteroides* to CREO or CLEO and/or MHT may be related to their distinct composition of membrane fatty acids (Trombetta et al., 2005). The composition of cell membrane is a determining factor related to physiological properties and stress resistance in bacterial strains (Baatout et al., 2005).

The impairment of the membrane integrity is a life threat for bacterial cells because alters functions such as permeability barrier, respiratory activity and transport (Baatout et al., 2005). Previous studies have reported that hydrophobic monoterpenes of *Citrus* spp. EOs may accumulate between the fatty acyl chains of the phospholipid molecules or within the lipid bilayer in bacterial cells (Cristani et al., 2007). Probably once membrane active constituents of CLEO or CREO were accumulated in enough amounts to cause a transmembrane ion gradient dissipation (increasing the ion permeability) the permeabilisation of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells occurred. Although membrane depolarisation decrease the cell activity because the electrochemical membrane potential is an essential part of the physiology of bacteria (Coronel-León et al., 2016), it does not imply in cell death (Léonard et al., 2016). Overall, the permeabilisation and depolarization allow the membrane

uptake of CLEO and CREO and consequently their action in distinct targets within the cell compromising different physiological functions.

Furthermore, exposure to CLEO or CREO in combination with MHT resulted in higher percentage of *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells damaged, permeabilised and depolarized compared to EOs or MHT alone. Heat treatment induces structural changes in cell membranes through the formation of pores (Burt, 2004), which favors the diffusion of OEs into the cell, resulting in higher damage to vital cell functions. Overall, with increase of exposure time larger amounts of EOs may be accumulated in membranes and diffused into the cell increasing the extension of damage.

Similar to observed for permeabilisation and depolarization, a higher percentage of cells with compromised respiratory and efflux was observed in combined treatments compared to CLEO, CREO or MHT applied alone. The oxidation reactions of the respiratory chain in bacterial cells are carried out by dehydrogenases linked to the cytoplasmic membrane. Divided into quinoproteins and flavoproteins, these enzymes transfer electrons to the oxygen generating energy for cell growth (Leónard et al., 2016). In another hand, efflux pumps are integral membrane proteins responsible by active extrusion of antimicrobials avoiding their accumulation to lethal levels inside cells (Varela et al., 2017; Puvanendran et al., 2018).

Previous study have reported that exposure to EOs may compromise the synthesis and functionality of proteins by affecting the membrane integrity (Surowsky et al., 2014; Hua et al., 2019). Moreover, the exposure to temperatures above of 40 °C, as that applied here may cause partial denaturation of proteins, inactivation of enzymes and DNA strand breaks (Lado and Yourself, 2002). Consequently, when exposed to combined treatments of CLEO or CREO and MHT, the effects on proteins involved in the respiratory chain and efflux activity were strengthen compromising their functionality in a greater number of *L. brevis* or *L. mesenteroides* cells.

The enhanced effects of CLEO or CREO in combination with MHT on physiological functions of *L. brevis* and *L. mesenteroides* agree with reductions in viable cells of these same bacteria observed in our previous study. CLEO or CREO alone reduced approximately 2 log₁₀ CFU/mL of *L.*

brevis and *L. mesenteroides* after 12 min of exposure in orange juice, while after this same time of exposure, combined treatments (CLEO or CREO and MHT) caused reductions of approximately 5 log₁₀ CFU/mL (Souza Pedrosa et al., 2019).

5. Conclusion

Results show that CLEO or CREO alone or in combination with MHT inactivate autochthonous *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells in orange juice through a multi-target mechanism by compromising the membrane integrity, increasing its permeability and decreasing polarity, as well as the respiratory activity and efflux activity. The extension of these effects varied between the EOs, the tested strains and depended on the exposure time. Overall, the extension of the simultaneous effects on physiological functions in *L. brevis* and *L. mesenteroides* cells was greater when of CLEO or CREO were applied in combination with MHT. This knowledge is helpful to design effective processes to preserve orange juice without compromise the quality and sensory aspects in the final product.

Acknowledgments

The authors thank CNPq-Brazil (Grant Number 401100/2014-6) for financial support and scholarships awarded to G. T. de Souza Pedrosa and MINECO Project (No. AGL2015-69565-P) for financial support.

Reference

Baatout, S., Boever, P., Mergeay, M. 2005., Temperature-induced changes in bacterial physiology as determined by flow cytometry. *Ann. Microbiol.* 55, 73-80.

- Basak, S., Ramaswamy, H. S., Piette, J. P. G., 2002. High-pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3, 223–231.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Carrillo, M. G., Ferrario, M., Guerrero, S., 2018. Effectiveness of UV-C light assisted by mild heat on *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 inactivation in carrot-orange juice blend studied by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Food Microbiol.* 73, 1–10.
- CitrusBR – National Association of Exporters of Citrus Juices, 2018. http://www.citrusbr.com/download/Relatorio_MAIO-2018_ano-civil.pdf, Accessed date: 03 June 2019.
- Comas-Riu, J., Rius, N., 2009. Flow cytometry applications in the food industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 999–1011.
- Coronel-León, J., López, A., Espuny, M. J., Beltran, M. T., Molinos-Gómez, A., Rocabayera, X., Manresa, A., 2016. Assessment of antimicrobial activity of N^α-lauroyl arginate ethylester (LAE[®]) against *Yersinia enterocolitica* and *Lactobacillus plantarum* by flow cytometry and transmission electron microscopy *Food Control.* 63, 1-10.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6300–8.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., 2011. Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 28, 900–909.

- Elez-Martínez, P., Escolà-Hernández, J., Soliva-Fortuny, R. C., Martín-Belloso, O., 2005. Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high-intensity pulsed electric fields. Food Microbiol. 22, 311–319.
- Espina L., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2014. Synergistic effect of orange essential oil or (+)-limonene with heat treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice at lower intensities while maintaining hedonic acceptability. Food Bioprocess Tech., 7, 471–81.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity alone or in combined processes. Food Control. 22, 896–902.
- Ferrario, M. and Guerrero, S., 2017. Impact of a combined processing technology involving ultrasound and pulsed light on structural and physiological changes of *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 in apple juice. Food Microbiol. 65, 83-94.
- Guerrouja, K., Sánchez-Rubiob, M., Taboada-Rodríguezc, A., Cava-Rodac, R. M., Marín-Iniestab, F., 2016. Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological qualityof orange juice. Food Bioprod. Process. 99, 20–28.
- Hammer, K. A., Heel, K. A., 2012. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in *Staphylococci* and *Enterococci*. Int. J. Antimicrob. Agents 40, 239–245.
- Hua, W., Lib, C., Daic, J., Cuic, H., Linb, L., 2019. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Ind. Crops Prod. 130, 34–41.
- Kim, D. K., Kim, S. J., Kang, D. H., 2017. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength VC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. Food Res. Int. 97, 280–287.

- Lado, B. H., Yousef, A. E., 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes Infect.* 4, 433-440.
- Léonard, L., Chibane, L. B., Bouhedda, B. O., Degraeve, P., Oulahal, N., 2016. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front. Microbiol.* 7, 1–16.
- Morishige, Y., Fujimori, K., Amano, F., 2015. Use of flow cytometry for quantitative analysis of metabolism of viable but non-culturable (VBNC) *Salmonella*. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1255–1264.
- Paravisini, L., Peterson, D. G., 2019. Mechanisms non-enzymatic browning in orange juice during storage. *Food Chemistry* 289, 320–327.
- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2017. Thermal treatments for fruit and vegetable Juices and beverages: a literature overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 668-691.
- Puvanendran, D., Cece, Q., Picard, M., 2018. Reconstitution of the activity of RND efflux pumps: a “bottom-up” approach. *Res. Microbiol.* 169, 442-449.
- Prado, D. B., Szczerepa, M. M. A., Capeloto, O. A., Astrathd, N. G. C. Santos, N. C. A., Previdelli, I. T. S., Nakamura, C. V., Mikcha, J. M. G. Abreu Filho, B. A., 2019. Effect of ultraviolet (UV-C) radiation on spores and biofilms of *Alicyclobacillus* spp. in industrialized orange juice. *Int. J. Food Microbiol.* 305, 108238.
- Silva, F., Ferreira, S., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *J. Med. Microbiol.* 60, 1479–1486.

- Silva, F., Lourenço, O., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2010. The use of DRAQ5 to monitor intracellular DNA in *Escherichia coli* by flow cytometry. *J. Fluoresc.* 20, 907–914.
- Souza, E. L., Almeida, E. T. C., Sousa Guedes, J. P., 2016. The potential of the incorporation of essential oils and their individual constituents to improve microbial safety in juices: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 753–772.
- Sousa Guedes, J. P., Medeiros, J. A. C., Silva, R. S. S., Sousa, J. M. B., Conceição, M. L., Souza, E. L., 2016. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria e maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 183–192.
- Souza Pedrosa, G. T., Carvalho, R. L., Berdejo, D., Souza, E. L., Pagán, R., Magnani, M., 2019. Control of autochthonous spoilage lactic acid bacteria in apple and orange juices by sensorially accepted doses of *Citrus* spp. essential oils combined with mild heat treatments. *J. Food Sci.* 84, 848-858.
- Surowsky, B., Fröhling, A., Gottschalk, N., Schlüter, O., Knorr, D., 2014. Impact of cold 504 plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: Inactivation kinetics and mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 174, 63–71.
- Snyder, A. B., and Worobo, R. W., 2018. The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control*, 85, 144–150.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2474–8.
- Varela, M. F., Andersen, J. L., Ranjana, K. C., Kumar, S., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., 2017. Bacterial resistance mechanisms and inhibitors of multidrug efflux pumps belonging to the

major facilitator superfamily of solute transport systems. *Front. Anti-Infective Drug Discov.* 5, 109-131.

Zhang, C., Chen, X., Xia, X., Li, B., Hung, Y. C., 2018. Viability assay of *E. coli* O157: H7 treated with electrolyzed oxidizing water using flow cytometry. *Food Control.* 88, 47-53.

Figure captions

Fig. 1. Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining with TO and PI after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M and S). The vertical axis indicates the fluorescence intensity of the TO; the horizontal axis indicates the fluorescence intensity of the PI. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.

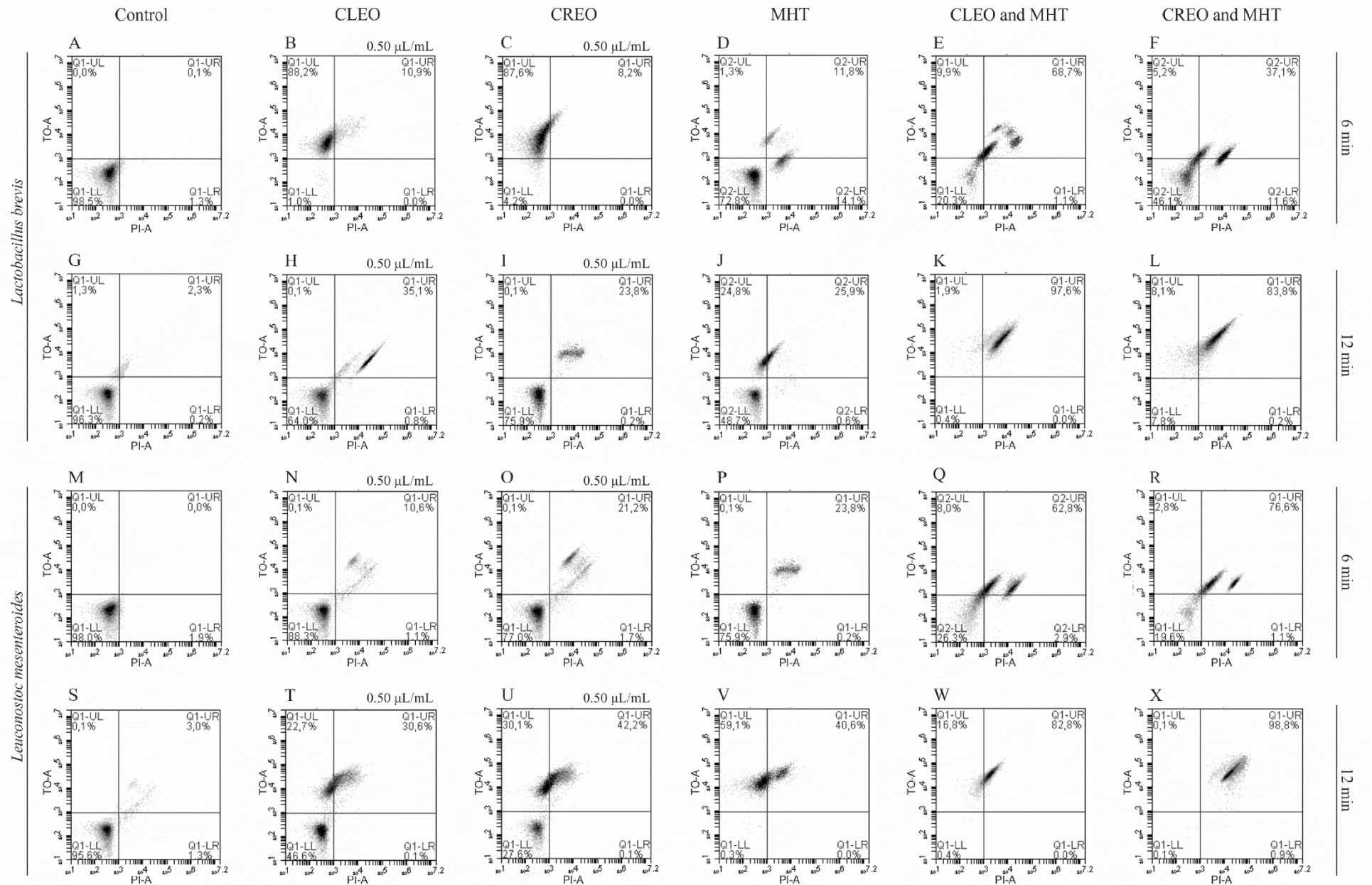


Fig. 2. Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining with BOX and PI after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M and S). The vertical axis indicates the fluorescence intensity of the BOX; the horizontal axis indicates the fluorescence intensity of the PI. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.

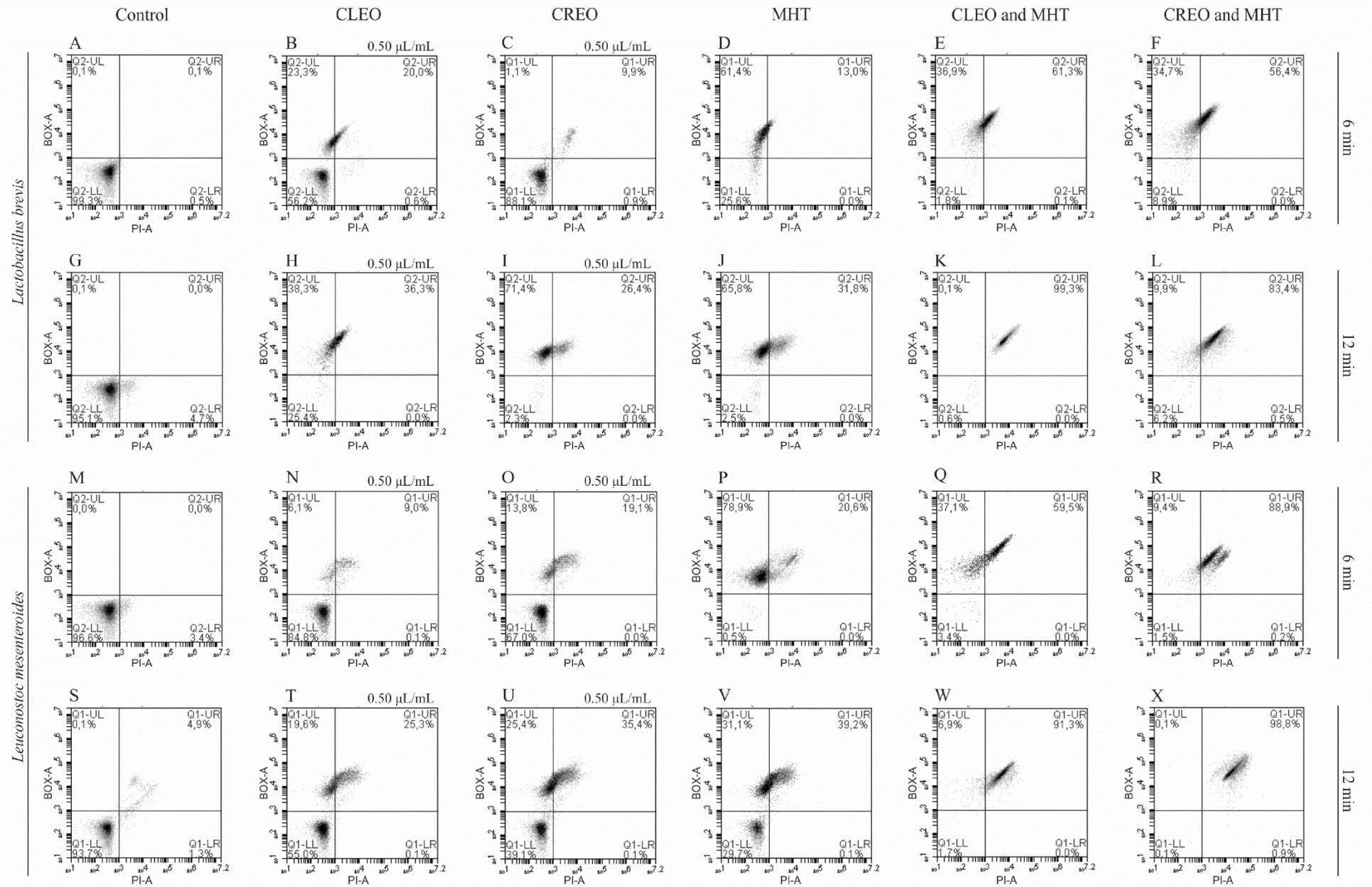


Fig. 3. Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining a CTC after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M and S). The horizontal axis indicates the fluorescence intensity of CTC-formazan; the vertical axis indicates the side-light scatter intensity. The respiratory active cell subpopulation was gated in the right rectangles; the inactive cell subpopulation was gated in the rectangles. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.

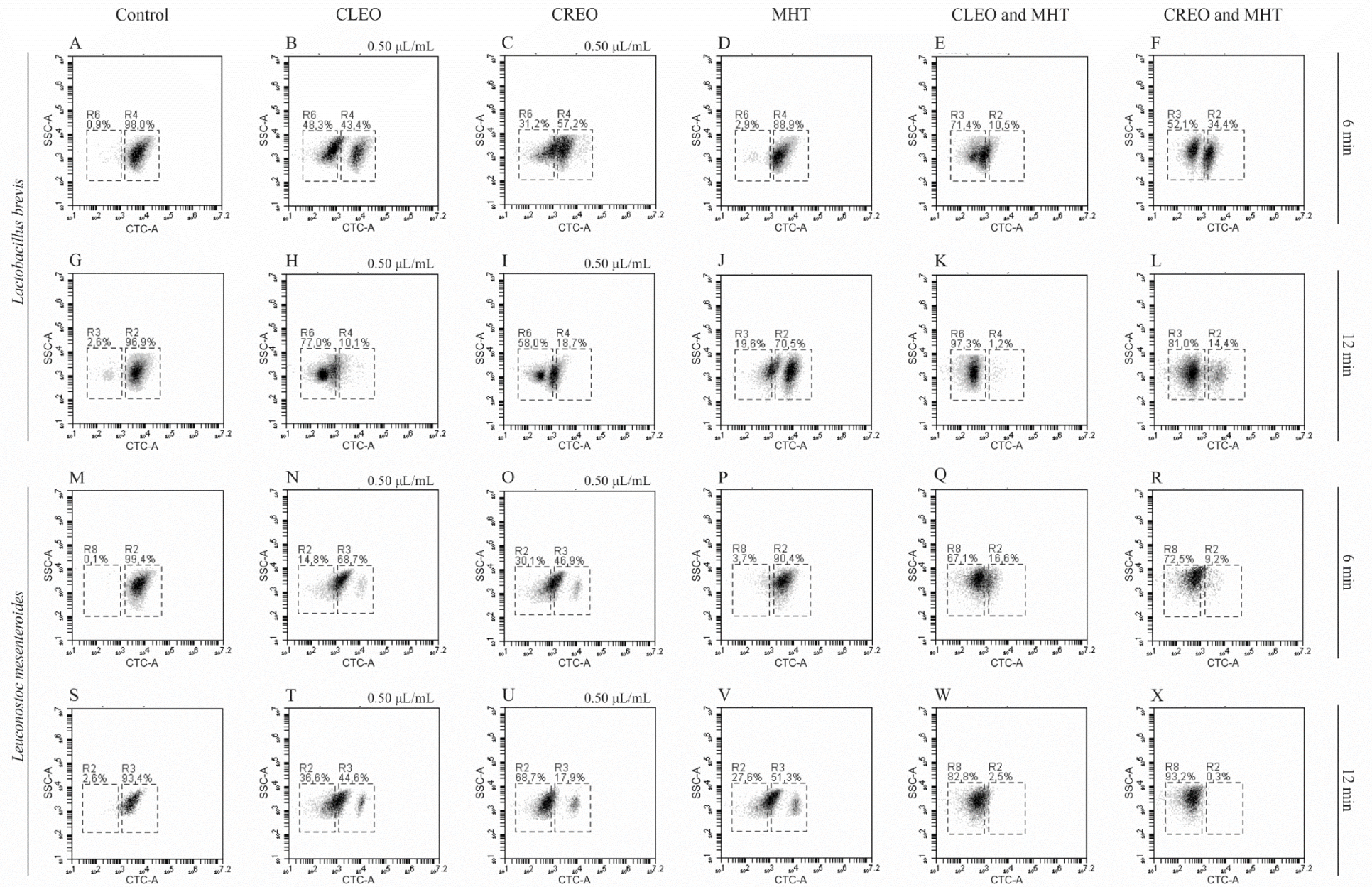
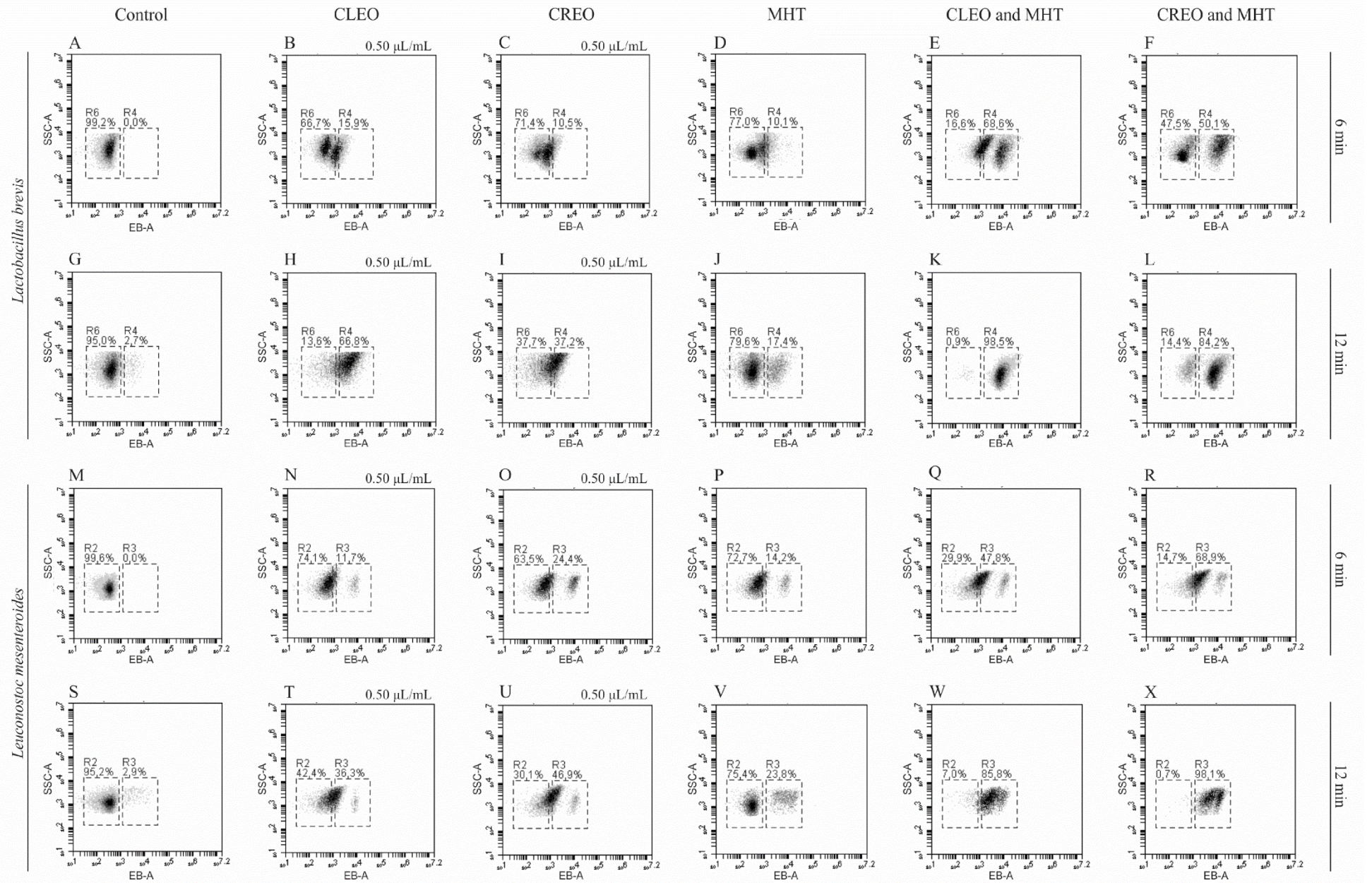


Fig. 4. Fluorescence density plots of *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc mesenteroides* in response to staining a EB after a 6 (A-F and M-R) and 12 min (G-L and S-X) exposure to *Citrus lemon* (CLEO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (B, H, N and T) or *C. reticulata* essential oil (CREO; 0.50 $\mu\text{L/mL}$) (C, I, O and U) alone and combined with mild heat treatment (MHT; 54 °C) (CLEO and MHT: E, K, Q and W; CREO and MHT: F, L, R and X) and MHT alone: orange juice at 54 °C (D, J, P and V) in orange juice. Control: orange juice without CLEO or CREO (A, G, M and S). The horizontal axis indicates the fluorescence intensity of EB; the vertical axis indicates the side-light scatter intensity. The negative stain subpopulation was gated in the left rectangles; the positive stain subpopulation was gated in the right rectangles. The percentages of the cells are presented in the four edges of each plot.



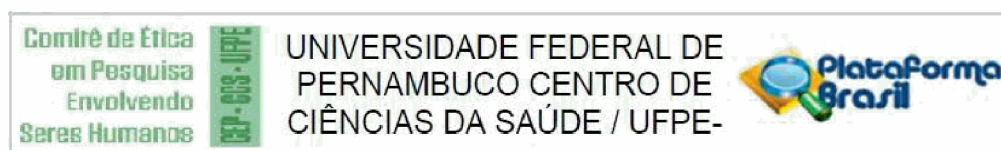
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação dos limiares sensoriais do OECL e OECR, o uso de BAL isoladas de suco, bem como os efeitos dos OECL e OECR isolado ou em combinação com TTM sobre as funções fisiológicas das cepas testes são reportados no produto gerado a partir do desenvolvimento da presente tese. Os resultados aqui reportados sugerem que os OEs avaliados, e em particular o OECL e OECR em combinação com TTM representam uma alternativa viável para o controle de bactérias deteriorantes de sucos de fruta. Ainda, os resultados reforçam que os desenhos experimentais com enfoque na avaliação dos OEs como conservantes de sucos devem ter como etapa inicial a determinação dos limiares sensoriais, uma vez que as concentrações abaixo do limiar de rejeição não foram efetivas no controle dos deteriorantes testados nos sucos de laranja e maçã.

Estudos futuros podem ser realizados para avaliar os efeitos da aplicação combinada do OECL e OECR e outras tecnologias de conservação para inibição de leveduras deteriorantes e bactérias patogênicas, bem como avaliar os efeitos de outras funções fisiológicas desses micro-organismos. E ainda, diante dos resultados desse estudo, pesquisas podem ser realizadas para determinar sensorialmente os limiares de aceitação comprometida e de rejeição de outros OEs em diferentes sucos de frutas.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aplicação combinada de óleos essenciais, temperaturas moderadas e campo elétrico pulsado na conservação de sucos de frutas tropicais

Pesquisador: Jossana Pereira de Sousa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43653415.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.125.993

Data da Relatoria: 29/06/2015

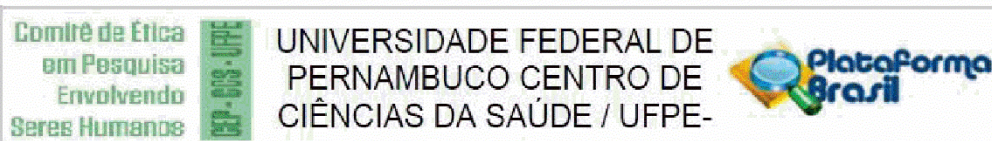
Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo experimental cuja proposta é tratar quatro tipos de sucos de frutas tropicais da região nordeste com óleos essenciais de *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta) e *Mentha arvensis* L. (hortelã-doce), aplicação de Tratamentos Térmicos Moderados e de Campo Elétrico Pulsado (CEP). Os parâmetros de qualidade dos sucos de frutas adicionados ou não dos óleos essenciais e submetidos ou não aos tratamentos com temperaturas moderadas e CEP, serão mensurados em diferentes intervalos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 dias) de armazenamento refrigerado a 7 °C (± 1 °C). Os parâmetros físico-químicos avaliados serão pH, acidez, sólidos solúveis, vitamina C e açúcares totais de acordo com metodologia padrão (AOAC, 2006). Após estes tratamentos os sucos serão submetidos à análise sensorial, por meio do teste de aceitação, com 200 provadores voluntários.

Os provadores realizarão o teste sensorial em condições controladas de temperatura e iluminação e provarão porções dos sucos adicionados de diferentes concentrações dos óleos essenciais, servidas em copos descartáveis (50 ml). Cada grupo de 50 provadores fará o teste com um tipo de suco, totalizando os 200 provadores. Os provadores farão uso de bolacha salgada e água para limpar os seus paladares entre as amostras avaliadas.

A aceitação da (aparência, cor, aroma, sabor, sabor residual, doçura, consistência e avaliação global), serão avaliados em uma escala hedônica de 9 pontos, variando de 1 (não gostei

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.125.993

muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo). A intenção de compra será avaliada utilizando uma escala hedônica de 5 pontos, variando de 1 (certamente não compraria) a 5 (certamente compraria). Amostras dos sucos sem adição dos óleos essenciais serão testadas de forma semelhante como um controle. O desenvolvimento dos testes sensoriais obedecerão a metodologia descrita por Azerêdo et al. (2011).

As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva e inferencial para determinação de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os tratamentos aplicados. Para a análise estatística utilizar-se-á o software Sigma Stat. 2.03.

Critério de Inclusão:

Os sujeitos participantes serão funcionários, alunos, professores e visitantes, maiores de 18 anos, que se encontrem no Campus I da Universidade

Federal da Paraíba nos dias de realização dos testes sensoriais, e que estejam interessados em participar voluntariamente da pesquisa. Serão

selecionados de acordo com seu interesse em participar da pesquisa e por possuir o hábito de consumir sucos de fruta (abacaxi, acerola, caju e manga), ou seja, prováveis consumidores desse tipo de produto.

Critério de Exclusão:

Pessoas menores de 18 anos. Indivíduos que não tenham o hábito de consumir sucos de fruta. Tabagistas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral. avaliar o potencial da aplicação combinada de óleos essenciais, tratamentos térmicos moderados e campos elétricos pulsados na conservação de sucos de frutas tropicais,

Objetivos específicos:

- a) avaliar a eficácia de óleos essenciais, tratamentos térmicos moderados e campos elétricos pulsados, quando aplicados isolados e em combinação, na inibição de cepas de bactérias contaminantes de sucos de frutas em inóculo misto, cultivadas em meio laboratorial e em sucos de frutas tropicais;
- b) investigar a ocorrência de injúria subletal nas cepas teste utilizadas nos ensaios após aplicação dos óleos essenciais, tratamentos térmicos moderados e campos elétricos pulsados, isolados e combinados;

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.125.993

- c) identificar os possíveis danos às células bacterianas, causados pelos tratamentos utilizados;
- d) verificar a influência dessa aplicação, isolada ou combinada, sobre indicadores físico-químicos de qualidade e atributos sensoriais de sucos de frutas tropicais ao longo do período de armazenamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O teste sensorial não apresenta riscos previsíveis ou mensuráveis, pois de acordo com a literatura os óleos essenciais adicionados aos sucos de fruta não apresentam efeitos tóxicos significativos in vivo nas concentrações utilizadas no estudo. Por ser considerado um alimento perecível, para controlar o fator contaminação, todo o procedimento de elaboração dos sucos foi conduzido de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, de acordo com as legislações vigentes. Além disto, antes da aplicação das análises sensoriais, as amostras foram submetidas a análises microbiológicas que demonstraram a qualidade higiênico-sanitária dos produtos elaborados, sendo descartados os produtos que apresentaram valores acima dos permitidos pela legislação específica, garantindo que o Sr (a) está recebendo amostras sem nenhum risco de contaminação microbiológica. Caso apresente alguma reação alérgica, não antes vivenciada, a equipe estará preparada a chamar o Serviço de Atendimento Móvel de Urgência – SAMU, por meio do número 192, assim como, na ausência deste, a encaminhá-lo ao hospital de referência mais próximo. Assim como, será oferecida uma prova mínima a cada avaliador, antes da degustação oficial, para verificar a sua aceitabilidade orgânica ao produto.

Benefícios: Considerando a propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas aromáticas que serão estudados, bastante relatada na literatura, espera-se encontrar um potencial efeito antimicrobiano quando utilizados em combinação com outras tecnologias de conservação, como tratamentos térmicos moderados e pulsos elétricos, frente à microbiota natural e micro-organismos patógenos comumente encontrados em sucos de frutas tropicais

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

sem comentários

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os termos exigidos pela resolução 466/12

Recomendações:

Sem recomendações

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.125.993

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

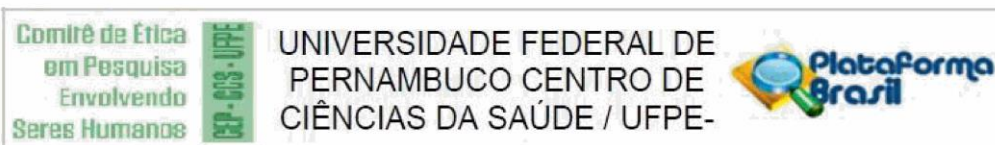
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.125.993

RECIFE, 26 de Junho de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

APÊNDICE B - Formulário para Análise Sensorial



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIAS DE ALIMENTOS**

TESTE DE ACEITAÇÃO DE SUCOS FRUTAS

Nome: _____ Data: ____/____/____
 Sexo: () M () F E-mail: _____
 Idade: () <18 () 18-25 () 25-35 () 35-45 () >45
 Telefone: _____ Escolaridade: _____

Você gosta de sucos de frutas? () Sim () Não

Com que frequência você consome sucos de frutas?

() Diariamente () 1 vez por semana () 1-2 vezes por mês () Ocasionalmente (menos de 1 vez por mês)

Por favor, anote o código da amostra, prove-a da esquerda para direita e indique no espaço em branco o número referente à resposta que melhor reflita seu julgamento em relação a aceitação global do suco de fruta. Antes de cada avaliação, você deverá fazer uso da água e da bolacha.

1. Desgostei muitíssimo
2. Desgostei muito
3. Desgostei regularmente
4. Desgostei ligeiramente
5. Indiferente
6. Gostei ligeiramente
7. Gostei regularmente
8. Gostei muito
9. Gostei muitíssimo

Atributo	Amostras									
Aceitação Global										

Obrigada!