



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
MESTRADO

CAROLINE JUNQUEIRA BARCELLOS LEITE

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D.C).
STAPF FRENTE À BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E MICROBIOTA AUTÓCTONE
EM SUCO DE ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**

JOÃO PESSOA

2015

CAROLINE JUNQUEIRA BARCELLOS LEITE

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D.C). STAPF
FRENTE À BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E E MICROBIOTA AUTÓCTONE EM
SUCO DE ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**

JOÃO PESSOA

2015

CAROLINE JUNQUEIRA BARCELLOS LEITE

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D.C). STAPF
FRENTE À BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E E MICROBIOTA AUTÓCTONE EM
SUCO DE ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – *Campus I*, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Co-orientadora: Prof^ª.Dra. Vivyanne dos S. F.Silva

JOÃO PESSOA

2015

CAROLINE JUNQUEIRA BARCELLOS LEITE

**EFEITO INIBITÓRIO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (D.C).
SATPF FRENTE À BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E MICROBIOTA AUTÓCTONE
EM SUCO DE ABACAXI (*Ananas comosus* (L.) Merrill)**

Dissertação _____ em ____/____/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – Orientador
Departamento de Nutrição/UFPB

Examinador Interno

Profa. Dra. Lúcia Raquel Ramos Berger
PPGCN/UFPB

Examinador Externo

Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira
Centro de Educação e Saúde - UFCG

2015

A Deus,

*Aos meus pais por minha formação,
pelo amor e por sempre me apoiarem,*

*Ao meu marido
Alexandre e aos meus filhos Bernardo
e João Gabriel pelo amor e incentivo;*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer-se presente em todos os momentos, não me fazendo desistir e me mostrando o para quê e não o por quê das situações;

Aos meus pais Victor Marchezani Barcellos e Suzane Maria Junqueira Barcellos por terem me ensinado todos os valores que tenho hoje. A determinação, a honestidade, a dignidade, a resiliência e a humildade, são transmitidos por exemplos e vocês meus pais, foram e serão exemplos em minha vida.

Ao meu marido Alexandre César Cunha Leite, pessoa fundamental, que sempre tem me apoiado, estando ao meu lado sempre. Sem você não seria possível cursar essa Pós-Graduação. Muito obrigado, lhe admiro muito como pessoa e profissionalmente, sabia que me inspiro em você quando sinto alguma dificuldade. As relações saudáveis são assim, lhe impulsionam, e você, sempre fez esse papel em minha vida, como tenho feito na sua.

Aos meus dois filhos, Bernardo Barcellos Leite e João Gabriel Barcellos Leite, por todos os momentos em que entenderam a minha ausência e o meu cansaço; e por saberem que a ausência momentânea era por uma razão importante na vida da mamãe.

Ao Professor Doutor Evandro Leite de Souza, pela orientação e por me aceitar como orientanda, confiando e acreditando que poderia executar esse projeto.

À minha co-orientadora Vivyanne dos Santos Falcão Silva pelos conselhos concedidos.

À Professora Maria Lúcia da Conceição, pelo carinho, torcida e toda ajuda oferecida em todos os momentos dentro do laboratório, estando sempre disposta a ajudar. Por pessoas como a Senhora Professora o mundo fica melhor de se viver.

À Jossana Pereira de Sousa, que ao longo dessa jornada me ajudou em muitos experimentos. Saiba que você foi muito importante em todos os momentos, desde os ensinamentos com sua experiência na área de microbiologia de alimentos, até a sua presença amiga sempre disposta a compartilhar.

À Isabella Medeiros, por ter me ajudado e me ensinado muito assim que entrei no laboratório. Você foi uma pessoa especial que me acolheu e me ajudou em um momento em que precisava muito, por isso lhe agradeço de coração.

A Alberto Costa, Amanda, Winnie, alunos da iniciação científica, que desempenharam papel essencial no desenvolvimento dessa dissertação. Mesmo não vinculados diretamente ao projeto me ajudaram sempre, mesmo quando não pedia, mas observavam que estava precisando de um suporte.

A Danilo Elias Xavier, pessoa que tive a grata felicidade em conhecer, muito obrigado pelas orientações e por aguçar minha curiosidade na área da microbiologia. Sua posição inquisidora instiga e influencia.

À Estefânia Garcia, sua presença dentro do laboratório e a convivência diária foram especiais e determinantes na execução do projeto. Você sempre estava disposta a me ajudar. Muito obrigado mesmo Esté.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, Ana Júlia, Kataryne, Raquel, Nelson, Rayssa, Geanny. Trabalhar perto de vocês fez com que os dias de muito trabalho fossem mais prazerosos.

As amigas da turma da Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Helena, Paloma, Samara, Isabella e Vanessa pela amizade construída.

À Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da UFPB pela oportunidade cedida para a obtenção do título de Mestre.

Ao CNPq pelo apoio financeiro instituído para a elaboração desse projeto.

“Todos os erros humanos são impaciência, uma interrupção prematura de um trabalho metódico.”

Franz Kafka.

RESUMO

A produção frutífera é muito expressiva no Brasil, destacando-se o cultivo do abacaxi, *Ananas comosus* (L.) Merrill. Fruta essa de sabor e aroma intenso, utilizada para industrialização de sucos, com uma boa aceitação para consumo. Apesar do suco de frutas não caracterizar-se como meio de contaminação frequente de micro-organismos patogênicos, a ocorrência e o aumento dos casos de surtos vinculados por esses alimentos vem surgindo. Nesse sentido, a combinação das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais em diferentes matrizes alimentares tem levado a investigação desses óleos como conservantes de alimento e sua atuação nas propriedades físico-químicas e sensoriais do produto. Diante deste contexto, este estudo objetivou avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (OECC), frente a bactérias contaminantes de suco de abacaxi (*Listeria monocytogenes* (ATCC7644), *Escherichia coli* (UFPEDA224) e *Salmonella enterica* Serova Enteritidis Serova (UFPE414) em inóculo misto, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), bem como a influência da aplicação desse OECC no crescimento e sobrevivência do inóculo misto. Além disso, foi verificado a eficácia do OECC frente a microbiota autóctone no suco de abacaxi; e a avaliação dos parâmetros físico-químicos e sensoriais do suco com OECC. O valor da CIM encontrado foi de 5 µL/mL frente ao inóculo misto. Concentrações inferiores a CIM (2,5 µL/mL -CIM/2 e 1,25 µL/mL -CIM/4) foram capazes de diminuir a contagem de *L. monocytogenes* e *E. coli* no suco de abacaxi a valores \geq a 5 log (UFC/mL) após 15 minutos de exposição no suco. Para *S. Enteritidis* , o mesmo nível de inibição foi detectado após 15 minuto de exposição ao OECC nas concentrações de 5 µL/mL, 2,5 µL/mL. Quando o OECC foi incorporado no suco na concentração de 1,25 µL/mL, foi necessário um intervalo de tempo de 1 hora para o estabelecimento de uma redução \geq a 5 log em *S. Enteritidis*. Em concentrações de 0,6 µL/mL – CIM/8, intervalos de 1h e 45 min foram necessários para alcançar uma redução \geq 5-log em *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente; enquanto, 12 h foram necessárias para alcançar similar redução em *S. Enteritidis*. O OECC (5 µL/mL, 2,5 µL/mL e 1,25 µL/mL) foi capaz de reduzir em \geq a 5 log a contagem de bactérias mesófilas, bactérias ácido lácticas e bolores e leveduras que ocorrem naturalmente em suco de abacaxi em intervalo de tempo máximo de 2 h. Uma redução de \geq 5 log não foi observada em micro-organismos da microbiota autóctone na concentração de OECC (0,6 µL/mL). As propriedades físico-químicas (pH, acidez titulável e sólidos solúveis) do suco de abacaxi contendo o OECC (2,5 µL/mL-CIM/2 e 1,25 µL/mL-CIM/4) foram mantidas em relação ao controle. As amostras de suco com OECC (2,5 µL/mL e 1,25 µL/mL) que passaram pelo painel sensorial apresentaram boa aceitação para algumas propriedades sensoriais (aparência, odor, viscosidade), mas parâmetros de sabor, sabor residual e aceitação global tiveram avaliações insatisfatórias dos painelistas. O OECC mostrou-se como uma alternativa eficaz na segurança alimentar e nos atributos sensoriais acima citados quando aplicado em suco de abacaxi. Assim, estudos complementares do OECC em suco de abacaxi com tecnológicas complementares não térmicas podem ser utilizadas para se obter um equilíbrio entre a segurança microbiológica e os aspectos sensoriais do produto.

Palavras chave: *Cymbopogon citratus*, *Ananas comosus* (L.) Merrill, suco, bactéria patogênicas, microbiota autóctone.

ABSTRACT

The fruit production is very expressive in Brazil, especially the pineapple cultivation, *Ananas comosus* (L.) Merrill. Fruit that taste and intense aroma, used for industrialization juices, with a good acceptance for consumption. Although the fruit juice not be characterized as a means of frequent contamination of pathogenic microorganisms, the occurrence and the increase in cases of outbreaks bound by these foods is emerging. In this sense, the combination of antimicrobial properties of essential oils in different food matrices has led to investigation of these oils as food preservatives and their performance on the physicochemical properties and sensory product. Given this context, this study aimed to evaluate the potential of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (OECC), compared to bacterial contaminants of pineapple juice (*Listeria monocytogenes* (ATCC7644), *Escherichia coli* (UFPEDA224) and *Salmonella enterica* Enteritidis Serova Serova (UFPE414) in mixed inoculum, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the influence of the application of OECC on growth and survival of the mixed inoculums. Moreover, the effectiveness of OECC was verified against the indigenous microbiota in pineapple juice; and the evaluation of physical, chemical and sensory parameters of juice with OECC. The value of MIC found was 5 $\mu\text{L} / \text{mL}$ against the mixed inoculum. Concentrations lower than MIC (2.5 uL / mL -CIM / 2 and 1.25 uL / mL -CIM / 4) were able to decrease the count of *L. monocytogenes* and *E. coli* in pineapple juice values $\geq 5 \log$ (CFU / mL) after 15 minutes of exposure in the juice. *S. enteritidis*, the same level of inhibition was detected after 15 minutes exposure to concentrations in 5 μL OECC / ml, 2.5 uL / mL . When OECC was incorporated into juice at a concentration of 1.25 uL / mL , a 1 hour time interval to establish a $\geq 5 \log$ reduction in *S. enteritidis* was necessary. At concentrations of 0.6 uL / mL - MIF / 8, 1 h 45 min intervals were required to achieve a $\geq 5 \log$ -in *E. coli* and *L. monocytogenes*, respectively; while, 12 h were necessary to achieve similar reduction in *S. Enteritidis*. The OECC (5 uL / mL , 2.5 uL / mL and 1.25 uL / mL) was able to reduce in $\geq 5 \log$ count of mesophilic bacteria, lactic acid bacteria, molds and yeasts that occur naturally in juice pineapple maximum time interval of 2 hr. A reduction of $\geq 5 \log$ was not observed in microorganisms of the indigenous microbiota in the concentration of OECC (0.6 uL / mL). The physico-chemical properties (pH, titratable acidity and soluble solids) of pineapple juice containing the OECC (2.5 uL / mL -CIM / 2 and 1.25 uL / mL -CIM / 4) were kept in the control . The juice samples with OECC (2.5 uL / mL and 1.25 uL / mL) that passed through the sensory panel showed good acceptance for some sensory properties (appearance, odor, viscosity), but parameters of flavor, aftertaste and acceptance overall had unsatisfactory ratings of the panelists. The OECC proved to be an effective alternative in food safety and sensory attributes mentioned above when applied to pineapple juice. Therefore, further studies on the OECC pineapple juice with no additional thermal technology can be used to achieve a balance between the microbiological safety and sensory aspects of the product.

Keywords: *Cymbopogon citratus*, *Ananas comosus* (L.) Merrill, juice, pathogenic bacteria, indigenous microbiota.

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. GC-MS analysis of the essential oil from <i>C. citratus</i> D.C. Stapf. (constituents detected in concentration $\geq 1\%$).....	80
Table 2. Duration of exposure for a ≥ 5 -log reduction of <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. Enteritidis</i> , in mixed population, in pineapple fruit juice containing different concentrations of the essential oil from <i>C. citratus</i> D.C. Stapf. (CCEO).....	81
Table 3. Duration of exposure for a ≥ 5 -log reduction of naturally Occurring micro-organisms in fresh in pineapple fruit juice containing different concentrations of the essential oil from <i>C. citratus</i> D.C. Stapf. (CCEO).....	82
Table 4. Physico-chemical parameters of pineapple juice containing or not the essential oil from <i>C. citratus</i> D.C. Stapf. (CCEO), and stored at 7 °C.....	83

LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1- Principais países produtores de frutas (dados de produção no ano de 2010).....	19
--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Coloração da polpa dos dois cultivares de abacaxi.....21
com maior produção no Brasil
- Figura 2 - Estrutura química de alguns compostos presentes.....29
em óleos essenciais.
- Figura 3 - Estrutura química de alguns compostos de óleos.....30
essenciais
- Figura 4 - Esquema da preparação do inóculo misto das cepas.....37
bacterianas teste.
- Figura 5 - Esquema de organização da microplaca utilizada na.....40
determinação da Concentração Inibitória Mínima do óleo
essencial de *C. citratus* frente a cepas de *L. monocytogenes*,
E. coli, *S. Enteritidis*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC- American Type Culture Collection

BHI- Brain Heart Infusion

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DTA's - Doenças Transmitidas por Alimentos

EMB- Eosin Methylen Blue

FAO - Food and Agriculture Organization – United Nations

FDA - Food and Drug Administration

GRAS - Geralmente Reconhecido como Seguro

ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods

ISO – International Standard Organization

MRS- Man Rogosa Sharpe

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCA- Plate Count Agar

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SDB- Sabourad Dextrose Broth

UFC - Unidade Formadora de colônia

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 FRUTICULTUTA: ASPECTOS GERAIS E CARACTERÍSTICAS DO ABACAXIZEIRO	18
2.1.1 Aspectos gerais	18
2.1.2 Características do abacaxizeiro	20
2.2 SUCOS DE FRUTAS: ASPECTOS GERAIS, MICROBIOTA AUTÓCTONE E CONTAMINANTE.....	22
2.2.1 Aspectos gerais	22
2.2.2 Microbiota de frutas e sucos de frutas	23
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS: OCORRÊNCIA E ASPECTOS QUÍMICOS DE SEUS CONSTITUINTES	27
2.4 <i>Cymbopogan citratus</i> D.C. (Stapf.).....	31
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. citratus</i>	36
3.3 MICRO-ORGANISMOS TESTE E INÓCULO MICROBIANO	36
3.4 MATRIZ ALIMENTAR	37
3.5 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. citratus</i>	38
3.5.1 Identificação dos constituintes do OECC	38
3. 6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO OECC	39
3.7 EFEITO DO OECC SOBRE A VIABILIDADE BACTERIANA EM SUCO DE ABACAXI.....	40
3.8 EFEITO DO OECC SOBRE A MICROBIOTA AUTÓCTONE DE SUCO DE ABACAXI.....	41
3.9 AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DE QUALIDADE DO SUCO DE ABACAXI E AVALIAÇÃO SENSORIAL	42
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE- A	57
ARTIGO ORIGINAL	57

A 5-log inactivation of <i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Salmonella</i> Enteritidis by <i>Cymbopogon citratus</i> D.C. Stapf. essential oil in pineapple juice.....	57
APÊNDICE –B.....	84
ANÁLISE SENSORIAL	84
APÊNDICE-C.....	85
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	85

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma área de terras agricultáveis férteis de 388 milhões de hectares, e quase 13% de toda a água doce disponível no planeta, apresentando grande contribuição para o abastecimento de alimentos no mundo (FERNANDES; DANTAS, 2006). O país é o terceiro maior produtor mundial de frutas, apresentando cultivo frutícola em todos os estados. A produção mais relevante em volume destaca-se para: laranja, banana, abacaxi, melancia e mamão, que, juntas, somam aproximadamente 30 milhões de toneladas (FACHIELLO et al., 2011).

Estima-se uma expansão do setor de agronegócio até o ano de 2023 no mundo, e, principalmente, do interesse por alimentos que atuem na promoção da saúde com capacidade de redução do risco de certas doenças, como produtos naturais e orgânicos, frutas e hortaliças, além de alguns tipos de alimentos processados e semi-prontos (SANTOS; SILVA, 2010). Dentro dessa vertente, os sucos de frutas, que são consumidos e apreciados em todo mundo, por serem fontes naturais de carboidratos, carotenoides, vitaminas e minerais, vem ganhando cada vez mais mercado (PINHEIRO et al., 2006; MELETTI; SAMPAIO; RUGGIERO, 2011). Dentre as frutas com aceitação na forma de suco, destaca-se o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill), muito apreciado no mercado interno devido à sua polpa suculenta e saborosa, com grande potencial de comercialização internacional, pois é bastante apreciada nos países do continente Americano e na Europa (CUNHA, 2006).

Frutas e legumes frescos quando processados possuem período curto de vida de prateleira, pois são submetidos a processos de rápida deterioração, principalmente por meio da ação de micro-organismos, seja pela microbiota autóctone ou por agentes microbianos incorporados ao longo da manipulação e processamento. Apesar do índice de doenças causadas pelo consumo de frutas e vegetais ser menor quando comparado aos produtos de origem animal, as frutas, vegetais frescos, sucos não pasteurizados e frutas minimamente processadas têm sido relatados como veículos emergentes de surtos de doenças transmitidas por alimentos. Muitos micro-organismos patógenos, parasitas e vírus têm sido isolados de frutas e vegetais, com destaque para *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*. Essas bactérias estão entre as causas mais frequentes de contaminação biológica destes alimentos, principalmente como consequência da manipulação e conservação inadequada, além da contaminação cruzada entre produtos crus e processados (BASTOS, 2006; DI CAGNO et al., 2013).

Atualmente, considerável parcela da população tem buscado substituir o consumo de compostos sintéticos incorporados como conservantes em alimentos por alternativas mais naturais, porém com a exigência da manutenção da segurança microbiológica dos alimentos. O desenvolvimento e aplicação de antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais (OEs) com largo espectro de ação, e capaz de promover a conservação da qualidade e segurança do produto por longo período, atrelado à manutenção da sua qualidade sensorial, tem sido de interesse para a indústria alimentícia (AZEREDO et al., 2011; SIVAKUMA.; BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

Os OEs possuem diversas aplicações principalmente na saúde, agricultura, cosméticos e na alimentação. Pesquisadores de todo o mundo têm caracterizado uma gama de propriedades biológicas dos OEs que incluem: antimicrobiana, antiviral, antimutagênica, anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e atividade anti-protozoários. Os OEs possuem baixa toxicidade em mamíferos e são facilmente biodegradáveis (BAKKALI et al., 2008; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Dentre os OEs, àquele obtido da espécie vegetal *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., popularmente conhecida como capim-limão, tem sido considerado uma substância alternativa para uso em sistemas de conservação de alimentos (OWAMAH; ALFA; DAHUNSI, 2014). O OE de *C. citratus* (OECC) possui largo espectro de atividade antibacteriana em relação a bactérias Gram positivas e Gram negativas, e vem sendo estudado em diversas aéreas (SHANKAR; KARUPPAYIL, 2014). Sua propriedade antibacteriana tem sido atribuída principalmente à presença de constituintes majoritários como citral, geraniol e mirceno (MIRGHANI; LIYANA; PARVEEN, 2012).

O estudo da aplicação de OEs e seus constituintes individuais como antimicrobianos em sucos de frutas é importante, já que, o Brasil é um dos grandes produtores mundiais de frutas e de seus produtos derivados. Além disso, há um aumento na demanda por produtos alimentícios que apresentem baixos níveis ou ausência de conservantes sintéticos, mas que apresentem segurança microbiológica. A aplicação isolada ou associada desses compostos ou técnicas de conservação como alternativas que alterem o mínimo possível a condição natural desses produtos têm crescido. Para tanto, um maior interesse no estudo e aplicação desses OEs é oportuno. Considerando estes aspectos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito inibitório do óleo essencial de *C. citratus* frente a bactérias contaminantes de sucos de frutas (*E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*), quando ensaiadas em inóculo misto, utilizando suco de abacaxi como matriz de cultivo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FRUTICULTURA: ASPECTOS GERAIS E CARACTERÍSTICAS DO ABACAXIZEIRO

2.1.1 Aspectos gerais

A OMS (Organização Mundial de saúde) e a FAO (Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas) no ano de 2013, recomendam um consumo mínimo de 400 g de frutas e verduras por dia, excluindo tubérculos ricos em amido. Essa determinação faz-se necessária para a prevenção de doenças crônicas, como doenças cardíacas, câncer, diabetes e obesidade, bem como para a prevenção e correção de várias deficiências de micronutrientes.

A produção de frutos e produtos hortícolas tem apresentado um notável crescimento em todo o mundo. Essa produção tem crescido a uma taxa anual de cerca de três por cento na última década. Em 2011, quase 640 milhões de toneladas de frutas e mais de 1 bilhão de toneladas de vegetais foram produzidos mundialmente. A produção de produtos hortícolas gera altos retornos econômicos por unidade de terra, oferecendo perspectivas promissoras de renda, especialmente para pequenos agricultores e em áreas onde a disponibilidade de terra para cultivo é escassa (FAO, 2013).

Os três maiores produtores mundiais de frutas são China, Índia e Brasil, como demonstrado na tabela 1, sendo eles responsáveis por 43,6% da produção total mundial e tendo suas produções destinadas, principalmente, aos mercados internos. A presença das frutas brasileiras no mercado internacional é ainda modesta (menos de 2% do volume total), de modo que esforços contínuos de entidades públicas e privadas na divulgação da fruticultura nacional se fazem necessários. Apesar de apresentar-se classificado entre os três maiores produtores mundiais, o Brasil, encontrava-se em 2008, na 15ª posição no ranking dos exportadores mundiais de frutas. Do total de frutas produzidas no país, 47% foram consumidos *in natura* e 53% foram destinados para o processamento. Dentre os 47% das frutas frescas, apenas 2% foram exportadas, e do total processado, 29% destinaram-se à exportação (SANTOS et al., 2008; DERAL, 2012).

As frutas que mais contribuem no volume da produção brasileira são laranja, banana, abacaxi, melancia e mamão, que totalizam aproximadamente 30 milhões de toneladas. A área plantada com frutas no país é de aproximadamente 1,9 milhão de hectares. A fruticultura no Brasil participa diretamente na economia através do valor das exportações e mercado interno.

Essa atividade agrícola destaca-se por seu caráter econômico-social, pois está presente em todos os estados brasileiros, gerando 5,6 milhões de empregos diretos e equivalendo a 27% do total da mão de obra agrícola do país. A atividade frutícola possui um considerável efeito multiplicador de renda com força suficiente para dinamizar economias locais como alternativa para regiões com poucas opções de desenvolvimento (FACHIELLO et al., 2011).

O consumo de frutas tropicais vem aumentando no mercado interno e internacional, devido ao crescente reconhecimento do valor nutritivo e terapêutico destes alimentos. O Brasil possui uma grande variedade de espécies de frutas nativas e “exóticas” subexploradas e de enorme potencial para a agroindústria. Essas frutas possuem mercado garantido para consumidores que colocam ênfase em seu consumo e escolhem alimentos com a presença de nutrientes capazes de prevenir doenças degenerativas. Além disso, há o potencial dessas frutas, e dos subprodutos gerados durante o seu processamento, para o isolamento de fotoquímicos específicos para a aplicação em suplementos nutracêuticos, aditivos alimentares e novos produtos voltados para alimentação. Tal perspectiva contribui também para a valorização de resíduos gerados no processo agro-industrial com grande impacto econômico e ambiental (SILVA et al., 2014).

Tabela 1- Principais países produtores de frutas (dados de produção no ano de 2010).

PAÍSES	ÁREA (hectares)	Produção (toneladas)	Produção (%)
China	13299,094	190161,340	26,1
Índia	6948,950	86038,600	11,8
Brasil	2548,730	41522,181	5,7
Estados Unidos	1235,325	28250,377	3,9
Turquia	1337,623	19240,404	2,6
Itália	1317,653	18052,136	2,5
Irã	1293,834	16910,521	2,3
Espanha	1609,160	16893,520	2,3
México	1277,845	16854,079	2,3
Filipinas	1163,632	16302,821	2,3
Demais Países	27762,043	278216,372	38,2
Total	59793,889	728442,351	100

FONTE: FAO, elaboração DEARL, 2012.

A participação das frutas na alimentação da população brasileira correspondia a 24,5% (dos itens consumidos) em 2003 de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar - POF/IBGE (2003). Entretanto, pesquisas realizadas pelo Ministério da Saúde em 2010 revelaram um aumento na presença de frutas e verduras alcançando 30,4% para a população com mais de 18 anos. Desse total, 18,9% consumiam diariamente 400g de frutas e verduras.

O valor de consumo detectado no ano de 2010 foi 2,6 vezes maior do que o registrado em 2006 (BUENO; BACCARIN, 2012).

Dados do IBGE (2010) mostram que a banana prata, laranja pêra, mamão e maçã são as frutas mais consumidas no Brasil (NOGUEIRA, 2011). Dentro da produção nacional de frutas frescas, os estados das regiões norte e nordeste se destacam. Embora não existam estudos sobre os tipos de sucos mais consumidos no Brasil, é notório o consumo dos sucos de laranja, laranja com cenoura, abacaxi e abacaxi com hortelã.

2.1.2 Características do abacaxizeiro

O abacaxizeiro, espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill, pertence à família Bromeliacea, monocotiledônea de clima tropical, originário da Américas, sendo característico de regiões tropicais e subtropicais. O fruto tronou-se conhecido por intermédio dos navegantes europeus em contato com as tribos das Américas. Ao ser descoberto, os exploradores o denominaram “piña” por sua semelhança com a pinha e com os estróbilos do pinheiro. Posteriormente, os ingleses acrescentaram a denominação “apple” à palavra “pine” e, então, o fruto passou a ser reconhecido em inglês como “pineapple”. A disseminação e a expansão do consumo se deram por meio dos navegantes que carregavam o fruto a bordo e durante a viagem abandonavam as coroas nos portos e desembarque. Somente a partir do século XVI, é que o abacaxizeiro ficou conhecido como uma espécie cultivada (CRESTANI et al., 2010).

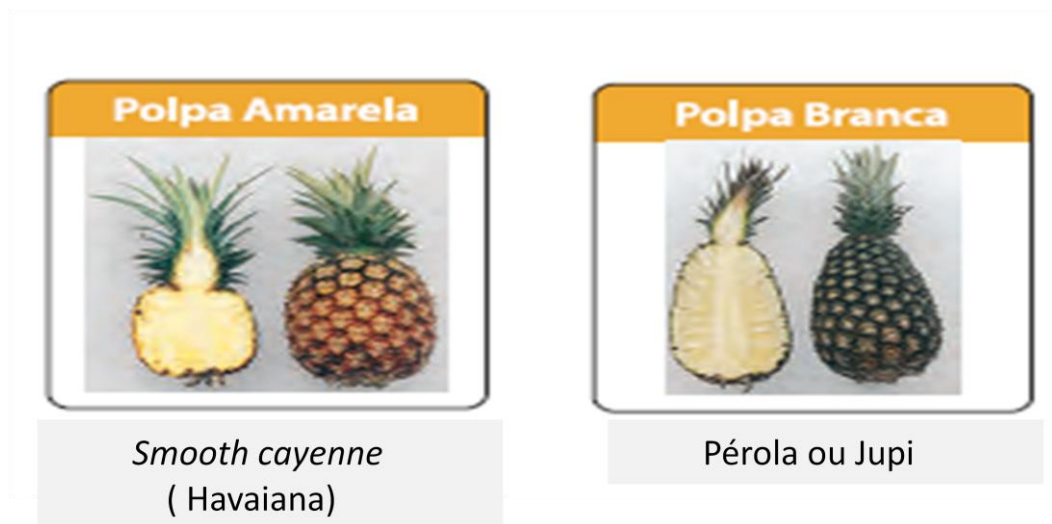
A aparência do fruto é caracterizada pelo tamanho, forma, e ausência de desordens mecânicas, fisiológicas e patológicas, tanto interna quanto externamente. Os compostos relacionados com a qualidade nutricional do fruto são vitaminas, minerais, açúcares solúveis, , fibras insolúveis como hemicelulose e lignina e solúveis como pectina (SILVA et al., 2010).

O abacaxi apresenta sabor e aroma intenso, utilizado tanto para o consumo “in natura” como para industrialização de sucos, pedaços em caldas e geleias. Caracteriza-se como uma das frutas cultivadas com maior exigência nutricional, apresentando alta demanda de nutrientes em relação às outras espécies frutíferas. O Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi, sendo que no ano de 2010 foram produzidos aproximadamente 1470 milheiros de abacaxis com um rendimento de 24.500 frutos por hectare (KRAUSE et al., 2013).

A maior parte dos frutos do abacaxizeiro cultivados no Brasil se destina ao mercado interno, na forma de fruta “in natura”. A sua produção está distribuída principalmente nos estados do Norte e Nordeste, onde se cultiva a variedade nacional Pérola ou Branco de Pernambuco. Esta maior produção se relaciona a uma acidez menos pronunciada do fruto e

por ser colhido em regiões quentes durante o ano inteiro, o que repercute em melhor aceitação pelo consumidor brasileiro, representando aproximadamente 80% da produção nacional. A cultivar *Smooth cayenne* ou “Hawai” ou “Havaiana” é produzida principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo, sendo preferida no mercado externo em função de suas características e da coloração da polpa. O abacaxi, por ser uma fruta não-climatéria, apresenta uma influência marcante do seu ponto de colheita sobre o sabor, principalmente nos cultivares que apresentam acidez mais pronunciada (BENGOZI et al., 2007; MELENETTI; SAMPAIO; RUGGIERO, 2011).

Figura 1- Coloração da polpa dos dois cultivares de abacaxi com maior produção no Brasil.



FONTE: CEAGESP, 2003.

O abacaxi representa o segmento frutícola de maior importância no Estado da Paraíba, Estado classificado como o segundo maior produtor brasileiro, com uma produção de 273,91 milhões de frutos no ano de 2010. O abacaxi é cultivado em 37 municípios Paraibanos, destacando-se como principais produtores os municípios de Santa Rita, Itapororoca, Araçagi e Pedras de Fogo. O Estado destaca-se pela qualidade do fruto produzido devido as suas condições ambientais favoráveis. No Estado da Paraíba, a cultivar Pérola é a mais plantada, apresentado um maior rendimento por hectare (MARTINS et al., 2012).

Mudanças nos padrões de consumo de alimentos vêm ocorrendo nas últimas décadas, e tem-se observado que muitos consumidores estão mais preocupados com a qualidade na escolha dos alimentos (BENGOZI et al., 2007). Assim, alguns parâmetros utilizados para a avaliação da boa qualidade e estado de maturação do abacaxi são importantes, por ser tratar de uma fruta não-climatéria. Um desses parâmetros é a determinação do teor de sólidos

solúveis (°Brix), o qual é medido por meio do uso de aparelho refratômetro, que permite que o abacaxi possa ser monitorado de forma prática e com leituras que possam ser realizadas até mesmo no campo (SOUTO, 2004). O valor determinado segundo as Normas de Classificação do Abacaxi (CEAGESP, 2003) é de °Brix de 12, no mínimo, para que o fruto seja considerado maduro.

Fatores como pH e acidez também estão associados com o processo de amadurecimento do fruto. Os valores de pH do cultivar *Smooth cayenne* são menores que aqueles encontrados no cultivar Pérola, com valores que variam de 3,5 a 3,8 e de 3,55 a 3,97, respectivamente. Os frutos cultivados no verão apresentam acidez moderada, sendo excelentes no sabor e aroma, ao contrário dos cultivares produzidos em épocas ou regiões mais frias, os quais produzem frutos com menores teores de carboidratos e cor e aroma inferiores (BENGOZI, 2007).

2.2 SUCOS DE FRUTAS: ASPECTOS GERAIS, MICROBIOTA AUTÓCTONE E CONTAMINANTE

2.2.1 Aspectos gerais

A definição para suco determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária caracteriza o produto “como uma bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de sua origem por processamento tecnológico adequado e por tratamento que assegure sua segurança na conservação e apresentação até o momento do consumo” (BRASIL, 2009).

No ano de 2003, o Brasil apresentou um consumo de aproximadamente 2,2 bilhões de litros de sucos, nas mais diferentes formas, sendo que desses, 579 mil Litros foram de sucos integrais, com destaque para o suco de maracujá. O consumo per capita de sucos integrais no Brasil por pessoa no ano de 2006 foi de 4 L, frente a 2 L por pessoa/ano de sucos prontos para beber, néctares e drinques. O mercado de frutas e hortaliças processadas tem crescimento em todos os países, independente de serem desenvolvidos ou não, já que os consumidores buscam cada vez mais produtos prontos por força da comodidade e conveniência (SANTOS et al., 2008).

Estima-se que no Brasil ocorram perdas entre 30 a 40% da produção de frutas e hortaliças na fase da pós-colheita. Essas perdas são causadas por fatores patogênicos, fisiológicos, físicos e por manuseio, transporte e armazenamento incorreto, que aliados aos

custos de distribuição e comercialização elevam os preços dos produtos que chegam aos consumidores. Mesmo com essas perdas a comercialização de produtos derivados de frutas tem aumentado com um crescimento de cinco vezes nos últimos quinze anos. Entretanto, mesmo com a abundância na produção de hortifrutigranjeiros e, principalmente, de frutas, não há valorização adequada destes produtos, sendo que grande parte da produção é descartada na própria lavoura (SANTOS; SILVA, 2010).

O Nordeste está entre as principais regiões brasileiras produtoras de alimentos provenientes da transformação primária de frutas e hortaliças, resultando em matéria-prima para a indústria e para a transformação secundária de alimentos prontos para o consumo. A produção de hortaliças e frutas para a agroindústria oriunda dessas matérias-primas está concentrada nos polos da agricultura irrigada na maioria dos estados nordestinos (CUNHA, 2009). No mercado brasileiro e mundial há uma tendência apoiada por profissionais da área da saúde, de destacarem a importância do consumo de alimentos na melhoria da qualidade de vida dos indivíduos, dando destaque ao consumo de sucos e polpas de frutas, principalmente de clima tropical (SANTOS, 2008).

2.2.2 Microbiota de frutas e sucos de frutas

A população microbiana de plantas é em grande parte sujeita as condições flutuantes, físicas e nutricionais que cada espécie fornece, estabelecendo um nicho único em termos de composição química, capacidade de tamponamento, de compostos antagonistas naturais e de biota competitiva. Cada espécie abriga sua microbiota dominante e que pode ser influenciada por alterações de temperatura e condições adversas (HONG-YANG et al., 2000).

Frutas e hortaliças são colonizadas por micro-organismos ainda na planta, no campo, durante a colheita, bem como podem ser contaminadas durante o transporte, processamento e embalagem do produto. As frutas, principalmente àquelas que crescem junto ao solo apresentam inevitavelmente uma similaridade de microbiota com o solo onde estão sendo cultivadas. A população microbiana de frutas e vegetais crus varia entre 5 a 7 log de unidades formadoras de colônia por grama (DI CAGNO et al., 2013). A biota de frutas é dominada principalmente por leveduras, leveduras essas que muitas vezes antecipam a colonização por seu crescimento rápido, apresentando populações entre 2 a 6 log de unidades formadoras de colônia por grama (CHANPRASARTSUK; PRAKITCHAIWATTANA; SANGUANDEEKUL et al., 2010). Dependendo do tipo de fruta, espécies pertencentes a

gêneros como *Cryptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula* e *Debaromyces* estão presentes como parte da microbiota dominante (DI CAGNO et al., 2013).

As bactérias presentes em frutas são geralmente as mesmas carreadas do meio rural, caracterizando-se pela presença de *Pseudomonas* spp, *Erwinia herbicola*, *Enterobacter agglomerans*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus* spp. O gênero *Pseudomonas*, geralmente, é responsável por 50% a 90% da população microbiana em vegetais (BASTOS, 2006). As bactérias lácticas são uma pequena parte da microbiota autóctone de vegetais crus e frutas (com contagens entre 3 a 5 log de unidades formadora de colônia por grama), sendo hetero ou homo fermentativas. Algumas espécies já isoladas de frutos foram: *Lactobacillus plantarum*, em tomates, abóboras, cenouras, pepinos, berinjelas, beterrabas, abacaxi, mamão e ameixa; *Lactobacillus rossiae* isolado de abacaxi; *Leuconostoc mesenteroides* em couves, cenouras, pimentões, pepinos, berinjelas; e *Enterococcus faecalis* em feijões, alcaparras e melões (DI CAGNO et al., 2009; DI CAGNO et al., 2012). As bactérias lácticas são as bactérias de deterioração primária em sucos frescos não pasteurizados (SILVA et al., 2014).

Estudo realizado por Di Cagno e colaboradores (2010) para a identificação da microbiota autóctone presente no abacaxi (*Ananas comosus* L.) observou que ao contrário da grande diversidade microbiana de frutas tropicais, o abacaxi caracteriza-se como um ambiente seletivo, visto que apenas uma espécie de levedura se desenvolve (*Pichia guilliermondii*) e duas espécies de bactérias ácido-lácticas (*L. plantarum* e *Lactobacillus rossiae*).

A maioria dos sucos são bebidas ácidas (pH 3 - 4), com alto teor de açúcares (11 - 15 ° Brix). Entretanto, sucos com valores de pH próximos da neutralidade podem oferecer maiores riscos de contaminação por patógenos. Durante o processamento de produtos frescos e cortados há aumento do risco de contaminação e crescimento da população bacteriana devido a quebra da barreira exterior natural do alimento. A liberação de fluidos celulares de plantas e frutos, quando esses são picados ou ralados, fornece um meio nutritivo em que os patógenos, se presentes, podem sobreviver ou crescer. Assim, o processamento de produtos frescos sem procedimentos de saneamento adequados no ambiente aumenta o potencial de contaminação por patógenos (BASTOS, 2006). Além disso, o grau de manipulação e de mistura do produto em um grande número de operações gera oportunidades de contaminação. O potencial do patógeno em sobreviver ou crescer é aumentado pela alta umidade e teor de nutrientes em frutas e hortaliças processadas (FDA, 2008).

O crescimento de micro-organismos patogênicos e bactérias é uma ocorrência comum em suco fresco ou não pasteurizado. A pasteurização é identificada como uma eficaz desinfecção tecnológica para prolongar a vida de prateleira dos produtos. No entanto, o

processo térmico pode prejudicar atributos nutricionais e alterar a qualidade sensorial do produto (SHAMSUDIN et al., 2013). Irregularidades na origem da matéria-prima e no binômio tempo temperatura possibilitam o crescimento bacteriano.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e como consta na resolução nº12/2001, as DTAs são causadas pela ingestão de alimento contaminado por agente infeccioso específico, ou pelas toxinas produzidas por ele (BRASIL, 2001). A contaminação desses alimentos ocorre principalmente durante o cultivo, colheita, manipulação, processamento, distribuição e armazenamento (FIORI; OLIVEIRA, 2013).

O CDC (*Center for Disease Control and Prevention* - EUA) identificou uma série de micro-organismos associados às DTAs, os quais são de destaque devido a sua gravidade ou pela prevalência da doença que causam. Os patógenos associados ao consumo de frutas e vegetais frescos incluem *C. cayetanensis*, *E. coli* O157: H7, vírus da hepatite A, *L. monocytogenes*, Norovirus, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Apesar dos riscos de contaminação bacteriana aparentemente mínima em sucos de frutas, devido à sua alta concentração de ácidos orgânicos, a contaminação de sucos de frutas tem causado inúmeros surtos de doenças de origem alimentar. *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* podem desenvolver adaptações que lhes permitam sobreviver em ambientes ácidos, características presentes na maioria dos sucos de frutas (KIM; CHO, 2010).

L. monocytogenes é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporo, anaeróbio facultativo. É móvel devido a flagelos peritríquios, apresentando movimento característico de tombamento, que auxilia em sua identificação. Apresenta reação positiva para catalase e negativa para oxidase. A *L. monocytogenes* apresenta crescimento na faixa de 2,5°C a 44°C, embora existam relatos de crescimento a 0°C, além de suportar reptidos congelamentos e descongelamentos. (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Sua natureza, psicrófila, microaerófila e sua grande resistência a adversidades diferem esta espécie de muitos patógenos alimentares, estando sua emergência diretamente associada às mudanças nos hábitos alimentares dos países industrializados, marcadamente pela cadeia do frio (FAI et al., 2011).

Esta bactéria já foi isolada a partir de muitas amostras ambientais, como solo, esgoto, água, vegetação morta, bem como do conteúdo intestinal de animais e aves domésticas (RAY, 2004). *L. monocytogenes* é de grande preocupação em saúde pública, pois sua incidência tem aumentado em muitos países europeus e estima-se que 99% dos casos de listeriose sejam causados pela contaminação por produtos alimentares. Por se amplamente presente em ambientes rurais, a contaminação da matéria-prima que é utilizada pela indústria, facilita a

transmissão nas instalações de processamento, principalmente pela capacidade da bactéria em formar biofilme (DER- VEEN; ABEE, 2010).

E.coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, não formadora de esporo, anaeróbia facultativa e com faixa de crescimento entre 7 a 46°C dependendo da cepa. Está dentro da classificação do grupo de coliformes totais, com capacidade de fermentação de lactose com produção de gás quando incubadas de 44-45,5°C. Em vegetais frescos é o único indicador válido de contaminação fecal, pois os demais micro-organismos pertencentes a esse grupo são encontrados naturalmente nesse tipo de alimento (FRANCO, 2008).

Existem estirpes variadas de *E. coli*, sendo algumas designadas patogênicas pela sua capacidade de produzir toxinas, enquanto outras devido a infecção que causam quando ingeridas em determinados números. Ainda, genes de resistência a antibióticos têm sido detectados em cepas de *E.coli* (DOYLE; BEUCHAT; MONTVILLE, 2001). Algumas estirpes de *E. coli* podem causar diarreia, enquanto outras podem causar doenças respiratórias, infecções do trato urinário e pneumonia. Alguns tipos de *E. coli* são capazes de produzir uma toxina denominada Shiga. As bactérias que produzem essa toxina são chamadas "produtora de toxina Shiga" ou STEC (Stable Toxin *E. coli*). A estirpe de STEC mais comumente identificado na América do Norte tem sido a *E. coli* O157: H7 (GASTROENTEROLOGY WEEK, 2010).

E. coli O157:H7 têm sido rastreada em vários alimentos ácidos, incluindo sucos fermentados, bebidas lácteas, maionese, cidra de maçã e salame. Estes produtos têm valores de pH entre 3,5 a 4, sendo que o micro-organismo consegue prolongar sua sobrevivência em temperaturas refrigeradas de armazenamento (LU; BRUDT, 2015).

As salmonelas são pequenos bastonetes Gram-negativos, não-esporulados, sendo indistinguíveis da *E.coli* ao microscópio ou mesmo em ágar nutriente. As salmonelas são geralmente incapazes de fermentar lactose, porém glicose e outros monossacarídeos podem ser fermentados com produção de gás. Seu pH ótimo de crescimento é perto da neutralidade, mas seu crescimento já foi registrado em valores de pH de 4,05 com HCL e ácido cítrico. As temperaturas extremas de crescimento que já foram relatadas ficaram entre 5,3 e 6,2°C (JAY, 2004).

Salmonella spp. é encontrada largamente no solo, água, esgoto, animais, humanos, equipamentos de processamento e produtos alimentícios. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais que, em alguns casos, são portadores assintomáticos. *Salmonella* spp.

não é normalmente associada a produtos frescos, mas pode ocorrer nestes substratos em razão da contaminação por meio de esterco animais ou pessoas infectadas (BASTOS, 2006).

Os produtos agrícolas não processados, como hortaliças e frutas, e os alimentos de origem animal, como carnes cruas, leite e ovos, são veículos frequentes de *Salmonella* spp. A contaminação de origem fecal é geralmente a fonte de contaminação para os produtos agrícolas, pela exposição à água contaminada (BRASIL, 2011). A maioria das frutas e hortaliças em seu estado natural é susceptível à esporulação de micro-organismos a uma taxa que depende de vários fatores, intrínsecos e extrínsecos. Tais produtos se enquadram no grupo de alimentos ácidos ($4,0 > \text{pH} < 4,5$) ou alimentos muito ácidos ($\text{pH} < 4,0$), restringindo o crescimento de patogênicos, porém a presença de *S. typhimurim* já foi relatada em surtos de sucos de maçã - com pH igual ou superior a 3,7 (BASTOS, 2006).

Algumas frutas apresentam em sua superfície características que proporcionam uma maior adesão e colonização de bactérias. As frutas de superfície rugosa, que são referidas como redes facilitam esse processo. Como exemplo, pode-se citar melões rendilhados, laranjas, mangas, entre outros (FRANK, 2001). A relação da carga superficial da célula e a hidrofobicidade na força de adesão de *Salmonella* spp. na superfície do melão Cantaloupe já foi estudada. Os resultados desse estudo revelaram que *Salmonella* spp. destaca-se como microrganismo possuidor de elevada força de adesão, seguida por *E. coli* e *Listeria* spp. (UKUKU; SAPERS, 2001).

Todas as espécies de *Salmonella* spp. são patógenas ao homem. Nos Estados Unidos e na Europa, esta bactéria é considerada um grave problema de saúde pública, demandando não apenas a implantação de uma rede de notificação e informação sobre o patógeno, mas também recentes esforços para inclusão dos países da América Latina nestas ações de controle, incluindo a adoção de modificações de seus códigos sanitários (FAI et al., 2011).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS: OCORRÊNCIA E ASPECTOS QUÍMICOS DE SEUS CONSTITUINTES

Agentes antimicrobianos derivados de plantas, como os OEs, são reconhecidos há séculos para aplicação na preservação de alimentos. Algumas especiarias como cravo, canela, mostarda, alho e gengibre são utilizadas como alternativas para a saúde na Índia. No extremo Oriente, a presença e a importância dos OEs podem ser historicamente comprovadas a cerca de dois mil anos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

As plantas produzem uma diversidade de compostos que são metabolizados naturalmente ou em resposta a alguma invasão microbiana ou mesmo injúria física. Os óleos essenciais de plantas são líquidos aromáticos extraídos de diversas partes de plantas como raízes, cascas, folhas, sementes e frutas e que possuem atividade antimicrobiana conhecida. A composição do óleo pode variar de acordo com a época do ano da colheita e do método utilizado para a extração. As propriedades de diversos OEs já foram demonstradas não apenas como agente antimicrobiano, mas também como antiparasitário, antifúngico, antiviral e com atividade antioxidante (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Os óleos essenciais são compostos lipofílicos e altamente voláteis, formados por metabólitos secundários de plantas, que atingem peso molecular de 300 Kda, e que podem ser fisicamente separadas dos outros componentes da planta ou do seu tecido membranoso. Tal como definido pela Organização Internacional de Normalização (ISO), o termo "óleo essencial" é reservado a um produto obtido a partir de matéria-prima vegetal, quer por destilação com água ou vapor, ou a partir do epicarpo de frutas cítricas por um processo mecânico, ou por destilação seca, isto é, apenas por meios físicos. Por conseguinte, a maioria dos OEs disponíveis no mercado são obtidos por meio de processo de hidro-destilação (TUREK, STINTZING, 2013).

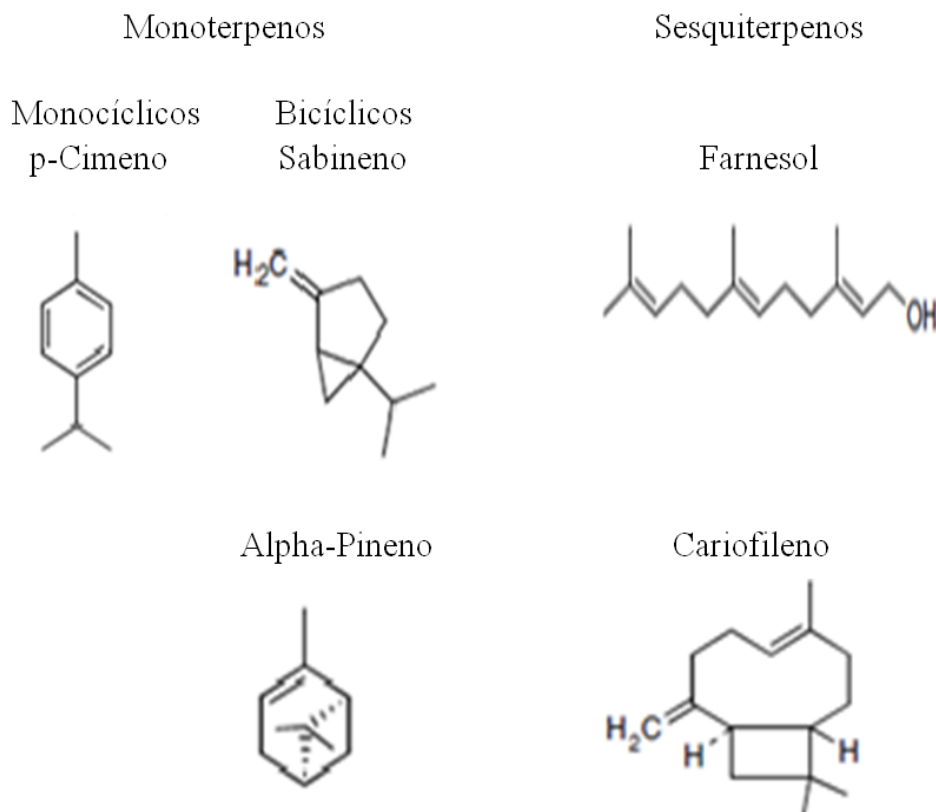
Os OEs são misturas naturais complexas que podem conter de 20 a 60 compostos em distintas concentrações, sendo caracterizados por dois ou três constituintes majoritários, que podem atingir até 70% da massa total do OE (ISMAN; WILSON; BRADBURY, 2008). Grupos distintos em sua origem biossintética dão origem aos OEs, sendo um deles formado pelos terpenos e terpenoides e o outro pelos constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados pelo baixo peso molecular. Os terpenos são hidrocarbonetos formados pela combinação de muitas unidades de isoprenos. São formados através da via do melavonato a partir do acetil- CoA, e possuem um esqueleto de hidrocarboneto que pode se rearranjar através de ciclases, assumindo a forma cíclica ou bicíclica. Os principais terpenos são os monoterpenos e os sesquiterpenos, como ilustrado na figura 2. Estes últimos são formados a partir da montagem de três unidades de isopreno (C15). A extensão da cadeia aumenta e o número de ciclizações também, o que permite uma grande variedade de estruturas. A função e a conformação química dos sesquiterpenos são muito semelhantes a dos monoterpenos (BAKKALI et al.; 2008; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Os terpenoides são terpenos que sofrem modificações bioquímicas através da atuação de enzimas com adição de átomos de oxigênio e remoção ou mudanças de grupos metil. Estes compostos podem ser divididos em alcoóis, ésters, aldeídos, cetonas e fenóis. A atividade

antimicrobiana dos terpenoides está ligada ao grupo funcional que apresentam em sua molécula. Alguns exemplos de terpenoides são: carvacrol, eugenol, geraniol e mentol ilustrados na figura 2 (ARFA et al., 2006; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

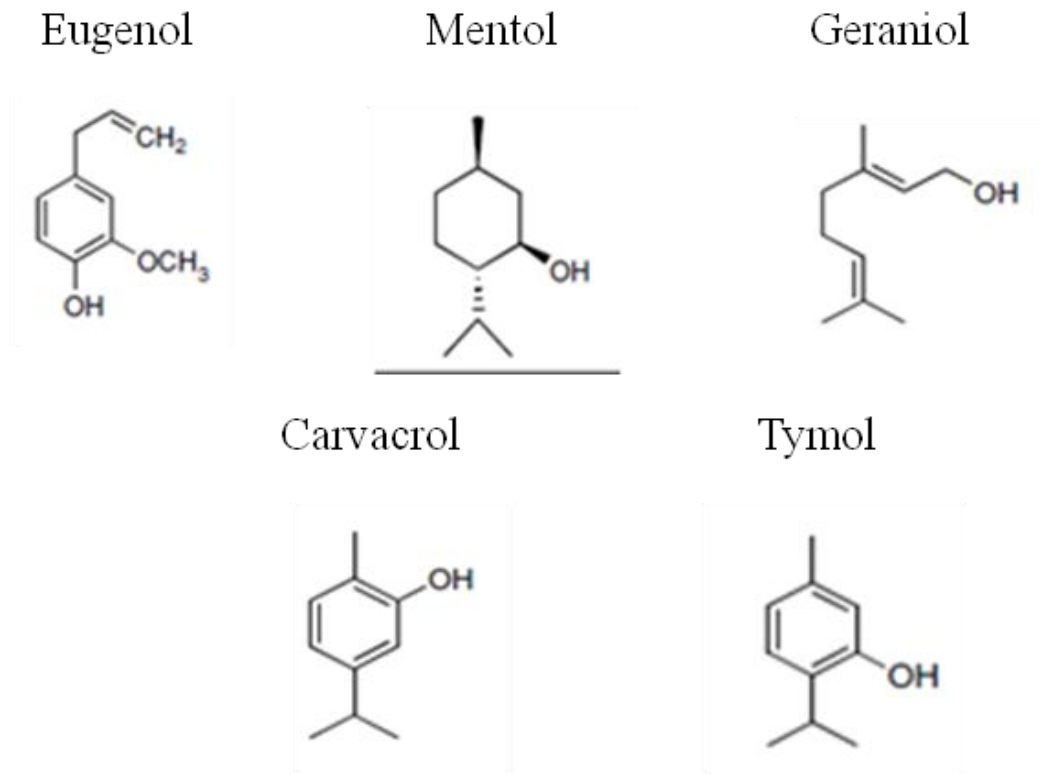
A resistência oxidativa de um OE pode ser expressa como o período de tempo necessário para se atingir o ponto crítico de oxidação, quando ocorre uma alteração súbita no processo oxidativo e/ou a presença de alteração sensorial e em sua cor. A degradação dos OEs depende de vários fatores químicos e edáficos que irão influenciar a possibilidade do produto sofrer oxidação, bem como o curso dessa reação. Fatores externos tais como temperatura, luz, acessibilidade ao oxigênio atmosférico precisam ser considerados. A composição do OE e a presença de impurezas podem alterar sua estabilidade. A presença de luz, ultravioleta ou luz visível podem acelerar esses processos de auto-oxidação, desencadeando a perda de hidrogênio com subsequente formação de radicais alquilo (CHOE; MIN, 2006; TUREK; STINTZING, 2013).

Figura 2- Estrutura química de alguns compostos presentes em óleos essenciais.



FONTE: Adaptado de BAKKALI et al.; 2008.

Figura 3- Estrutura química de alguns compostos de óleos essenciais



FONTE: Adaptado de BAKKALI et al.; 2008

Os compostos presentes nos OEs acumulam-se na bicamada lipídica das bactérias, causando uma desestruturação e ruptura da estrutura e alteração das suas funções. A atividade antimicrobiana dos OEs pode ser atribuída a sua característica lipofílica, que age de forma a perturbar a membrana plasmática microbiana, fazendo com que perca sua impermeabilidade a prótons e íons maiores. Quando há essa perturbação sobre a integridade da membrana, se estabelece uma disfunção, não só da barreira, mas também da sua atuação como matriz para enzimas e como um transdutor de energia (LIOLIOS et al., 2009).

Vários OEs e constituintes majoritários frente às diversas cepas microbianas apresentaram mecanismos distintos, dentre esses mecanismos os já conhecidos são: inibição enzimática com redução da atuação de enzimas, como lipase, protease e coagulase; distúrbio de membrana com inibição da atividade da ATPase; fluidificação da porção lipídica da membrana e diminuição da força motriz da bomba de prótons, bloqueio da bomba de efluxo, aumento da permeabilidade da membrana com inibição de determinados mecanismo relacionados à respiração celular e redução da síntese de fatores de virulência (LANGEVRLED; VELDHUIZEN; BURT, 2014).

De forma geral, os estudos têm demonstrado que os OEs são menos ativos frente à bactérias Gram-negativas quando comparada as Gram-positivas. A membrana externa das bactérias Gram-negativas possui lipolissacarídeos hidrofílicos (LPS), os quais criam uma barreira para macromoléculas e componentes hidrofóbicos, como os presentes no OEs (TROMBETTA et al., 2005)

2.4 *Cymbopogon citratus* D.C. (Stapf.)

A espécie vegetal *C. citratus* D.C. (Stapf.) (*C. citratus*) é conhecida vulgarmente por inúmeros nomes, tais como capim-limão, capim-santo, capim-cheiroso, capim-cidreira, capim-cidrão e citronela-de-java. Internacionalmente, a planta é conhecida sobre a denominação vulgar de *lemongrass*. *C. citratus* pertence à família Gramineae - subfamília Panicoidea, sendo uma planta aromática já cultivada para a produção comercial de OE. *C. citratus* possui um odor de limão e é empregada na indústria farmacêutica como matéria prima para a síntese de muitos compostos, inclusive de vitamina A (GUIMARÃES et al., 2008).

A planta apresenta-se como uma grama alta, perene, amplamente cultivada nos trópicos e subtropicais. Apresenta duas espécies distintas *C. flexuosus* (D.C) e *C. citratus* (D.C). Essa última tem sido cultivada ao longo dos anos para fins medicinais em diferentes países por todo o mundo. *C. citratus* é utilizada na medicina popular no tratamento de tosse, malária, distúrbios vasculares, neurológicos, gastrointestinais, estados febris e pneumonia (KHAN; AHMAD, 2012). Pesquisas já demonstraram seu efeito antidepressivo, antioxidante, anti-séptico, repelente de insetos e adstringente, bem como atividade inibitória frente a uma variedade de micro-organismos que compreendem bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos (SHIGEHARU; TOSHIO; HIDEYO, 2001; NGUEFACK; BUDDE; JAKOBSEN, 2004; NAIK et al., 2010).

C. citratus é uma das plantas mais utilizadas na medicina popular brasileira, e de maneira usual por meio da ingestão de infusão de suas folhas frescas (KHAN; AHMAD, 2012). O citral, frequentemente detectado como constituinte majoritário do OE de *C. citratus*, é citado como responsável pelas atividades bioativas atribuídas ao produto. O citral é constituído pela mistura de dois isômeros acíclicos de monoterpenos aldeídos, o geranial e o neral. O mirceno, outro constituinte presente em quantidades significativas o OE de *C. citratus*, caracteriza-se como um monoterpeno acíclico (CARLSON; MACHADO, 2001; MIRGHANI; LIYANA; PARVEEN, 2012).

O uso inadequado e de forma aleatória dos OEs pode implicar em riscos à saúde humana devido à possível ocorrência de mutações, efeitos cancerígenos e danos genéticos, os quais irão poderão ocorrer em maior ou menor magnitude de acordo com o tipo de OE e a quantidade utilizada (SOUSA; SILVA; VICCINI, 2010). O uso cada vez mais abrangente dos OEs exige uma avaliação de segurança, sendo essa questão cada vez mais complexa, pois a utilização dos OEs ainda não possui regulamentação em diversos países (SINHA et al., 2014).

Os constituintes formadores dos OEs são geralmente reconhecidos como sendo não-tóxicos, rapidamente absorvidos, metabolizados pelo fígado e excretados pelos rins. Em estudo realizado por Fandohan e colaboradores (2008), o efeito da toxicidade e tolerância gástrica em ratos Wistar do OEs de *C. citratus*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum* foi avaliado e apenas doses superiores a 2000 mg/Kg/dia apresentaram efeitos tóxicos nos animais.

Estudo realizado por Guerra et al. (2000) detectou que camundongos tratados com extrato fluido de *C. citratus* (30% e 60%) apresentaram sinais de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (30% e 80% dos animais tratados, respectivamente). Outro estudo com extrato aquoso de *C. citratus* (5; 10; 20 e 30 mg/mL) detectou citogenotoxicidade em células vegetais, com indução de alterações cromossômicas em raízes quando o vegetal (*Lactuca sativa* L) foi tratado com as concentrações mais elevadas do extrato (Sousa et al., 2010).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode levar a apoptose celular por alteração da capacidade redox intracelular. Assim, estudo realizado por Sinha (2014) avaliando três tipos de OEs determinou o grau de geração de ROS induzido por cada OE testado. O OE de *C. citratus* apresentou maior capacidade de geração de ROS quando comparado ao OE de palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb)) e citronela (*Cymbopogon wintrianus*). Achados desse estudo vão ao encontro do que já é determinado em relação a substâncias antioxidantes (como os OEs) que podem atuar como pró-oxidantes dependendo da concentração e da natureza das moléculas vizinhas (VILLANUEVA; KROSS, 2012). Antioxidantes bem conhecidos, tais como a vitamina C, α -tocoferol, carotenoides, flavonoides e fenóis já foram também relatados como pró-oxidantes em altas concentrações (DUARTE; LUNEC, 2005).

Os OEs de palmarosa, citronela, *C. citratus*, além dos constituintes citral e geraniol, já são classificados como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), pelo FDA. O OE de *C. citratus* tem sido utilizado em concentrações de 5 a 40 ppm na confecção de aromas em bebidas alcoólicas e não alcoólicas, chicletes, produtos de laticínios e produtos cárneos assados (Council of Europe, 2000).

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

A combinação de propriedades antimicrobianas e os aromas e sabores dos OEs que podem ser utilizados em alimentos tem levado à investigação sobre o seu uso como potenciais conservantes alimentares (FISHER; PHILLIPS, 2008; BANSODE; CHAVAN, 2012; MOSQUEDA-MELGAR.; RAYBAUDI-MASSILIA; MARTÍN-BELLOSO, 2012; LU.; BREIDT; DIAZ, 2013). Os antimicrobianos comumente encontrados na fração de OE das plantas já são bem estabelecidos, os quais apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana com potencial para o controle de bactérias patogênicas e de deterioração nos sistemas alimentares (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009).

Nas últimas décadas diversos estudos com foco na avaliação da atividade antimicrobiana dos OEs foram realizados, embora a sua grande maioria com o uso de meios sintéticos como matriz para desafio dos micro-organismos (SALDANHA; AVANCINI; WIEST, 2000; SOUZA et al, 2006; PEREIRA et al, 2008). No entanto, atualmente a utilização de matrizes alimentares tem sido preferida para uso nestes ensaios, uma vez que podem ajudar a aperfeiçoar a aplicação dessas substâncias em alimentos. A utilização de matrizes alimentares, em ensaios com antimicrobianos, reflete a disponibilidade de nutrientes e a composição do produto (CARRAMINÃNA et al., 2008). Em geral, a eficácia de muitos agentes antimicrobianos quando adicionados à matriz alimentar é reduzida, devido à composição química particular do substrato de crescimento (alimento) (GUTIERREZ; BARRY-RYAN, 2008). De modo geral, a sensibilidade das bactérias para o efeito antimicrobiano de OEs parece aumentar com a diminuição do pH no alimento e com a quantidade de oxigênio no interior da embalagem do produto. Em um valor de pH baixo, a hidrofobicidade dos OEs aumenta permitindo uma atuação mais eficaz nos lipídeos da membrana celular das bactérias alvo (BURT, 2004).

A presença de uma maior quantidade de lipídeo no alimento parece prejudicar a ação antimicrobiana dos OEs, em decorrência das características hidrofóbicas semelhantes, ocorrendo uma menor disponibilidade dos compostos terpênicos dos OEs para atuação sobre as células microbianas (que se mantém principalmente nas porções mais hidrofílicas do alimento) (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). As proteínas presentes nos alimentos facilitam o crescimento microbiano em decorrência da disponibilização de nitrogênio, porém há controvérsias em relação a seu efeito sobre a eficácia antimicrobiana dos OEs. Alguns estudos relatam a elevada capacidade de ligação das proteínas a compostos voláteis

aromáticos, dificultando a sua volatilização da matriz, o que, assim, poderia melhorar a atuação dos OEs nos alimentos (BARANAUKIEN, et al., 2008). Porém, outro estudo demonstrou que as proteínas do leite podem atuar como fatores limitantes da eficácia antimicrobiana dos OEs (DEVLIEGHERE et al., 2004). Relacionou-se esse efeito negativo sobre as propriedades antimicrobianas de OEs em decorrência da capacidade das proteínas do leite em se complexar com compostos fenólicos presentes em OEs, tornando-os indisponíveis para atuar sobre as bactérias-alvo (DEVLIEGHERE et al., 2004).

A presença de hidratos de carbono, e o seu aumento em 2,3% em extrato de tomate, causou aumento da eficácia antimicrobiana do OE de tomilho (*Thymus vulgaris* L) e orégano (*Origanum vulgare* L) (GUTIERREZ et al., 2009). Porém, Gutierrez et al. (2008) demonstraram impacto negativo da presença de amido (5% a 10%) na matriz alimentar frente a atividade antimicrobiana do OE de orégano e tomilho. Assim, o tipo de carboidrato parece ser mais determinante no estabelecimento de influência sobre a atividade antimicrobiana de OEs.

A aplicação de OEs em alimentos requer um conhecimento das propriedades de cada OE testado, da sua concentração Inibitória Mínima (CIM) frente uma variedade de microorganismos alvo, do modo de ação e do efeito sobre os componentes da matriz alimentar (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). As concentrações necessárias para que os OEs possam exercer sua atividade antimicrobiana em alimentos é, geralmente, mais elevada, quando comparada aos meios laboratoriais, o que pode causar um impacto negativo na aceitação do alimento por parte dos consumidores (BURT, 2004). Estudos em cada matriz alimentar e sua interação com o OE estudado devem ser realizados, visto que podem ocorrer interações do OE com diversos compostos presentes no alimento, vindo a alterar a sua composição e aceitabilidade (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Estudos recentes avaliando o efeito de diferentes OEs em distintas matrizes alimentares têm sido realizados com o propósito de se estabelecer concentrações que não causem modificações sensoriais significativas no alimento e que, em paralelo, sejam capazes de estabelecer a atividade antimicrobiana desejada. Espina e colaboradores (2014) avaliaram a aceitação de diferentes OEs em suco de tomate, sopa de vegetais e hambúrguer de frango e encontraram boa aceitação em alguns quesitos de acordo com o alimento e o tipo de OE utilizado. Neste estudo, o OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis* *Officinalis*), foi mais bem aceito em hambúrguer de frango, enquanto o OE de limão foi o melhor aceito em suco de tomate. Tomando como base estes aspectos, percebe-se a importância de estudos particulares

para cada combinação de OE e alimento de interesse com vistas ao alcance de uma inserção segura e com potencial de uso e aceitação pelos consumidores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos e no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e também no IPrFARM- Instituto de Pesquisas em Fármacos e Medicamentos/ NUCAAL- Núcleo de Caracterização e Análises - UFPB, todos localizados no Campus I – João Pessoa - PB.

3.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *C. citratus*

O OECC (Lote 0061) foi obtido da empresa Laszlo Aromoterapia Ltda (Belo Horizonte - Minas Gerais – Brasil), o qual extrai o produto por meio de hidrodestilação em escala industrial. O óleo essencial utilizado no estudo atendeu a todas as especificações exigidas concernentes a seu controle de qualidade (aparência, cor, impurezas, odor, densidade – 20°C, índice de refração – 20°C) conforme boletim técnico emitido pelo fornecedor.

3.3 MICRO-ORGANISMOS TESTE E INÓCULO MICROBIANO

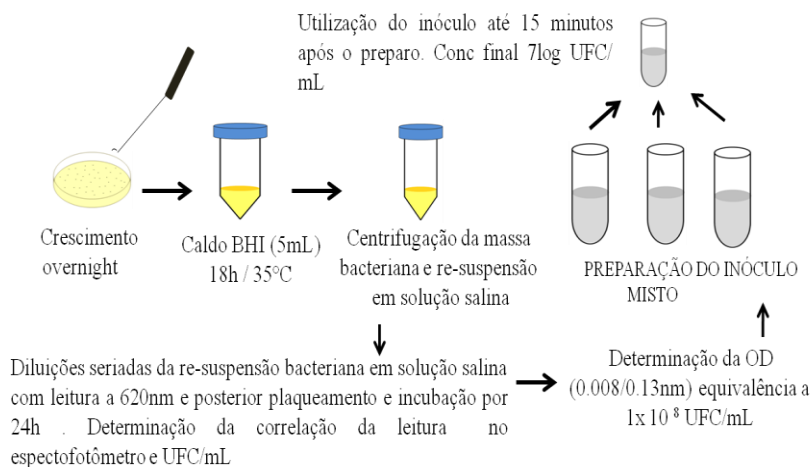
As cepas utilizadas como micro-organismos teste foram *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (UFPEDA 224) e *Salmonella enterica* Serova Enteritidis (UFPE 414). As culturas destes microrganismos foram obtidas da coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (Pernambuco - Recife - Brasil). As culturas estoque foram mantidas em criotubos contendo caldo BHI adicionado de glicerol (15%) à temperatura de – 20 °C

A padronização do inóculo bacteriano foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008). Para tanto, as cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em placas contendo ágar infusão de cérebro e coração BHI (Himedia, Índia) e incubadas *overnight* a 37 °C (18 - 24h). Em seguida, três colônias foram cultivadas em 5 mL de caldo BHI e cultivadas *overnight* à 37 °C com agitação (250 rpm). A massa celular obtida foi colhida por centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavada duas vezes em caldo solução salina (NaCl 0,85 g/100mL) estéril e re-suspensa em caldo solução salina estéril. As suspensões bacterianas obtidas foram submetidas a diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina estéril. A densidade óptica a 620 nm (DO620) da cultura bacteriana em cada diluição foi determinada em espectrofotômetro. Para a determinação do número de

unidades formadoras de colônias (UFC) de cada diluição, um volume de 0,1 mL da suspensão bacteriana foi inoculado na superfície de placas de Petri contendo BHI, e espalhado com auxílio de alça Drigalsky estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e, em seguida, a contagem do número de células viáveis foi determinada (UFC/mL). Com o número de colônias obtido, sendo corrigido pela respectiva diluição, foi determinado o número de células contidas no tubo onde foi encontrado valor de DO620 de 0,08 a 0,13, que correspondeu a aproximadamente 8 log UFC/mL.

Para os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima do OECC, a suspensão bacteriana obtida foi diluída (1:10) em solução salina estéril para obtenção de inóculo contendo aproximadamente 8 log UFC/mL. O inóculo misto das três cepas ensaiadas foi obtido por meio da mistura das suspensões bacterianas obtidas na proporção de 1:1:1 em um tempo máximo de 15 min após a preparação de cada inóculo com uma população microbiana final de 7 log UFC/mL.

Figura 4-Esquema da preparação do inóculo misto das cepas bacterianas teste.



FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA, 2015.

3.4 MATRIZ ALIMENTAR

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill), Pérola ou Branco de Pernambuco foi obtido na EMPASA (Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas – João Pessoa – Paraíba - Brasil) entre os meses de junho a dezembro de 2014. Os abacaxis no estágio de maturação comercial, foram selecionados pela a uniformidade de tamanho, forma, aparência e ausência de injúrias mecânicas ou infecções visíveis. Para a preparação de suco, os frutos

foram primeiro imersos em uma solução de hipoclorito de sódio desinfecção de superfície (1 mL / 100 mL, pH 7,2 ajustado com NaOH a 1 M) durante 15 min, lavados com água destilada estéril e secos durante 1 h num gabinete de segurança. Assim, os frutos foram descascados, picados e misturados com água destilada (1:10) usando um liquidificador doméstico. A mistura foi filtrada usando uma camada tripla de gaze e esterilizado por meio de autoclave (121 ° C, 1,1 atm, durante 15 min). O suco esterilizado foi armazenado em 50-mL de alíquotas a -20 ° C, e, quando necessário, uma alíquota era descongelado sob refrigeração (7 ± 1 ° C) e utilizada para os ensaios subseqüentes (RAYBAUDI-MASSILIA; MOSQUEDA-MELGAR; MARTÍN-BELLOSO, 2006).

3.5 PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. citratus*

As emulsões do OECC foram preparadas em caldo BHI com concentrações variando de 80 a 0,312 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Para a solubilização do óleo essencial foi utilizado o tween 80 (0,5% v/v, Sigma-Aldrich, EUA. A concentração ensaiada de (0,5%), v / v) de Tween 80 não apresentou nenhum efeito inibitório contra os organismos de teste.

3.5.1 Identificação dos constituintes do OECC

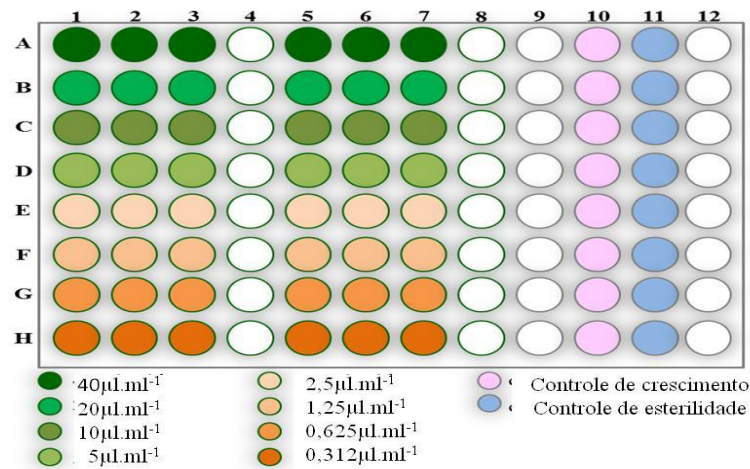
Os constituintes do OECC foram identificados por meio da utilização de um Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Os compostos foram separados em uma coluna RTX capilar ®-5MS (30m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). A programação da temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciada a 60°C, seguida de uma rampa de 3°C/minuto até atingir 240 °C, concluindo em tempo de corrida equivalente à 60 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o gás hélio utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 0,99 mL/minuto. O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons com uma temperatura da fonte de 200 °C, e com energia de ionização de 70V, variação de scan de m/z 40 a m/z 500.

Para a identificação dos compostos foi utilizado o banco de espectros da própria biblioteca do GC/MS, NIST/EPA/NIH Mass SpectralDatabase (Versão 1.7). A quantificação dos voláteis foi obtida através da normalização das áreas dos voláteis e expressos em percentual de área (%).

3. 6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO OECC

Os valores da CIM do OECC foram determinados por meio do método de microdiluição em caldo em microplaca de acordo com a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) com modificação (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). Inicialmente, um volume de 50 µL do inóculo bacteriano (aproximadamente 7 log UFC/mL) foi adicionado a cada poço da microplaca contendo 50 µL de caldo BHI adicionado de diferentes concentrações do OECC (40 a 0,312 µL/mL; contagem final de células viáveis de aproximadamente 6 log UFC/mL). Simultaneamente, foi preparado o controle de crescimento (positivo) e de esterilidade (negativo) (Figura 5). As microplacas foram envoltas com filme plástico para evitar a desidratação microbiana e garantir que não houvesse a volatilização do óleo essencial, seguindo-se por incubação a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina (0,01%, preparada em solução aquosa) (Inlab, Brasil em todos os poços da microplaca, seguindo-se por incubação a 37 °C por 20 minutos. Após este período foi realizada leitura visual do crescimento microbiano. A manutenção da cor azul nos poços foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano, enquanto o desenvolvimento de cor rosa ou incolor foi interpretada como presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é o indicador mais utilizado para avaliar condições de redução de substratos em meios de cultura (FUKUSHIMA; WEIMER; KUNZ, 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarfurina (cor rósea) (PALOMINO et al., 2002). A CIM foi definida como a menor concentração do OECC capaz de inibir o crescimento das cepas teste, ou seja, a menor concentração capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa.

Figura 5- Esquema de organização da microplaca utilizada na determinação da Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial de *C. citratus* frente a cepas de *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enteritidis*.



FONTE: Adaptado CARVALHO, 2015.

3.7 EFEITO DO OECC SOBRE A VIABILIDADE BACTERIANA EM SUCO DE ABACAXI

O comportamento das cepas bacterianas em inóculo misto foi observado em suco de abacaxi adicionado de diferentes concentrações do OECC (CIM, 1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/8 CIM) ao longo de 24 horas de exposição por meio da contagem de células viáveis. Inicialmente, 150 µL da suspensão bacteriana (aproximadamente 8 log UFC/mL) foram inoculados em suco de fruta, adicionado do OECC nas diferentes concentrações desejadas com um volume final de 6000 µL. (contagem final de células viáveis de aproximadamente 6 log UFC/mL). Os sistemas foram submetidos à incubação estática em temperatura de refrigeração (7 °C). Em diferentes intervalos de tempo (0,15, 30, 45 minutos; e 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas pós-incubação), uma alíquota de 100 µL de cada sistema foi diluída de forma seriada em solução salina estéril, sendo que 20 µL de cada diluição inoculados, por meio da técnica da microgota, em placas de Petri contendo ágar seletivo, como segue: ágar eosina azul de metileno (Himedia, Índia) para *E. coli*; ágar seletivo para *Listeria* adicionado de suplemento - *Listeria* II (Himedia, Índia) para *L. monocytogenes* e ágar *Salmonella-Shiguella* (Himedia, Índia) para *S. Enteritidis*. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). As placas inoculadas com as alíquotas coletadas dos sistemas que continham o OECC foram incubadas por um período adicional de 24 h em temperatura

adequada de crescimento em relação ao sistema controle. Os resultados foram expressos como o tempo de exposição para cada concentração testada de OECC para estabelecer uma redução ≥ 5 -log na contagem de células viáveis iniciais (UFC / mL no tempo zero) de cada cepa testada do inóculo misto, com a fórmula, $\log N_0 - N$, onde N e N_0 foram a contagem inicial e a contagem após incubação do suco com o OECC, no tempo determinado a 7 °C, respectivamente.

A capacidade de detectar baixos números de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* foi verificada em cada experimento pela adição de solução salina estéril em três amostras de suco inoculados com a diluição apropriada de cada uma das cepas testadas para conseguir contagens de aproximadamente 10^1 , 10^2 e 10^3 UFC / mL. As amostras foram vigorosamente misturada durante 30 s, e depois plaqueadas em ágar seletivo, como descrito acima. A amostra inoculada com o menor nível de células bacterianas que demonstraram crescimento (detecção de UFC) determinaram o limite de detecção do método. O limite de detecção de contagem de células viáveis foi de 10^2 UFC / mL para todas as estirpes de ensaio.

3.8 EFEITO DO OECC SOBRE A MICROBIOTA AUTÓCTONE DE SUCO DE ABACAXI

O efeito do OECC em diferentes concentrações (CIM, 1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/8 CIM) sobre a sobrevivência de alguns grupos de micro-organismos formadores da microbiota autóctone do suco de abacaxi foi avaliado em diferentes intervalos ao longo de 72 h de exposição. Para isso, inoculados o suco de abacaxi fresco (não submetido a processo de esterilização) adicionado do óleo essencial nas diferentes concentrações desejadas com um volume final de 6000 μ L foi preparado. Os sistemas foram submetidos à incubação estática em temperatura de refrigeração (7 °C). Em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 45 minutos; e 1, 2, 4,8, 12, 24, 48 e 72 horas pós-incubação), uma alíquota de 100 μ L de cada sistema foi diluída de forma seriada em solução salina estéril, sendo que 20 μ L de cada diluição foram inoculados, por meio da técnica da microgota, em placas de Petri contendo ágar seletivo para cada grupo de micro-organismo monitorado, como segue: ágar eosina azul de metileno (Himedia, Índia) para contagem de enterobactérias; ágar Sabouraud Dextrose (Himedia, Índia) para contagem de fungos; ágar contagem padrão para contagem de bactérias aeróbias mesófilas; e ágar Man-Rogosa Sharpe para contagem de bactérias ácido lácticas. Todas as placas foram incubadas por 24 a 48 horas a 37 °C. Após o período de incubação, realizou-se a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL

(HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). As placas inoculadas com as alíquotas coletadas dos sistemas que continha o OECC foram incubadas por um período adicional de 24 h em temperatura adequada de crescimento em relação ao sistema controle.

Os resultados foram expressos como o tempo de exposição para cada concentração testada de OECC para estabelecer uma redução ≥ 5 -log na contagem de células viáveis iniciais (UFC / mL no tempo zero) de cada cepa testada do inóculo misto, com a fórmula $\log N_0 - N$, onde N e N_0 foram a contagem inicial e a contagem após incubação do suco com o OECC, no tempo determinado a 7 °C, respectivamente. O limite de detecção do método foi de 10^2 UFC/mL para todos os micro-organismos monitorados.

3.9 AVALIAÇÃO DE ASPECTOS FÍSICO- QUÍMICOS DE QUALIDADE DO SUCO DE ABACAXI

Alguns parâmetros de qualidade físico-química de amostras de suco de abacaxi adicionadas ou não do OECC (1/2CIM, 1/4CIM) foram mensuradas ao longo do armazenamento sob temperatura de refrigeração (7 °C).

Os parâmetros físico-químicos avaliados, nos intervalos de 0 (imediatamente após a adição do óleo essencial) e 72 horas de armazenamento foram: sólidos solúveis, determinado por meio de leitura em refratômetro de bancada, sendo os resultados expressos em ° Brix (AOAC, 2006); pH, determinado por meio do uso de potenciômetro (pHmetro) digital provido de eletrodo de vidro e calibrado com solução tampão pH 7,0 e 4,0 (AOAC, 2006); acidez titulável: determinada por meio de titulometria utilizando NaOH 0,1 N na presença de fenolftaleína como indicador (AOAC, 2006); açúcares totais: determinado por meio de método titulométrico, utilizando solução de Fehling e fenolftaleína como indicador (AOAC, 2006); e vitamina C: determinada por meio de método oficial titulométrico (AOAC, 2002).

A avaliação sensorial foi realizada por meio de teste de aceitação com 60 membros com idade entre (20-35 anos) pré-selecionados de acordo com hábito de consumo para suco de abacaxi. Os painelistas permaneceram em cabines individuais sob condições controladas de temperatura e iluminação. Cada participante do painel recebeu três amostras de suco (sendo uma não inoculada e não-esterilizada) contendo as diferentes concentrações de CCEO testadas (2,5 µL/mL e 1,25 µL / mL). O CCEO foi incorporado em amostras de suco 24 h (e mantidas sob armazenamento refrigerado /7 ° C) antes do teste sensorial. As amostras de suco sem o OECC foi utilizada como controlo. As diferentes amostras de suco foram servidas em 30 mL em copos descartáveis, brancos, codificados com números de três dígitos aleatórios.

As amostras foram servidas ao mesmo tempo usando um método de ocultação de sequência aleatória, e servidas imediatamente após terem sido retiradas do armazenamento sob refrigeração. Os painelistas foram convidados a usar bolachas com baixo teor de sal e água para limpar o paladar entre as amostras avaliadas. A aceitação da aparência, odor, viscosidade, gosto, sabor residual e aceitação global foram avaliados em uma escala hedônica de 9 pontos, variando de 1 (desgostei muito) a 9 (gostei muito) (STONE; SIDEL, 1993). O trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética N° CAAE 43653415.6.0000.5208.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (repetições), sendo os resultados expressos com médias e desvio padrão dos ensaios. Para os ensaios de determinação dos valores de CIM, os resultados foram expressos como valores modais, visto que os resultados foram os mesmos em todas as repetições (MCMAHON et al., 2008). Nos ensaios físico-químicos, a análise estatística foi realizada para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey. O software Graphpad Prism 6.0 foi utilizado para a execução da análise estatística dos dados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D.M.S. **Contaminação microbiológica de alimentos: o caso particular de *E. coli***. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Alimentar)- Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2013.
- ARFA, A.B.; et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n.2, p.149-154, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **The official methods of analysis of AOAC international**. 18^o ed, Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 2006. 3000 p.
- AZEREDO, G.A.; et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**,v.44, n.5, p.1541-1548, 2011.
- BAKKALI, F.; et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chemistry Toxicology**, v.46, n.1, p. 446–475, 2008.
- BANSODE, D.S; CHAVAN.M.D. Studies on antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit juices against selected enteric pathogens. **International Research Journal of Pharmacy**, v.3, n.11, 2012.
- BARANAUSKIEN, R.; VENSKUTONIS, P.R.; DEWETTINCK, K., et al. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. **Food Research International**, v.39, n.5, p.413–425, 2006.
- BASTOS, M.S.R. **Frutas Minimamente Processadas: Aspectos de Qualidade e Segurança**. EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Fortaleza-Ce, p57, 2006.
- BECKY HERIGSTAD, B., HAMILTON, M., HEERSINK., J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiology Method**, v.2, n.1. p.121-129, 2001.
- BENGOZI, F.J.B.; et al. Qualidades físicas e químicas do abacaxi comercializado na CEAGESP – São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**,v.29, n.3, p.540-545, 2007.

BENNIS, S.; et al. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n.3, p. 454-458, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n.12, de 2 janeiro de 2001. Aprova Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 216, de 15 de setembro de 2004. Estabelece procedimentos de boas práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 set. 2004.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Decreto nº 6.871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº. 8.918, de 4 de junho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 jun. 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BUENO, G.; BACCARIN, J.G. Participação das principais frutas brasileiras no comércio internacional: 1997 a 2008. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, n.2, p.424-434, 2012.

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.

CARLSON, L.; MACHADO, R. Extration of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.21, n.6, p.33-39, 2001.

CARRAMINANA, J.J.; ROTA, C., BURILLO, et al 2008. Antibacterial efficiency of *Spanish satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. **Journal Food Protection**, v.71, n. 3, p. 502–508, 2008.

CARVALHO, R. J. **Efeito inibitório do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. frente a bactérias patogênicas e ácido lácticas de importância em queijo de coalho**. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 201

CEAGESP-A Companhia de Entrepósitos e armazéns gerais de São Paulo. **Folhetos de Classificação (Abacaxi)**, 2003. Disponível em: <<http://www.hortibrasil.org.br/jnw/images/stories/folders/abacaxi.pdf>>. Acesso em: 19 de Janeiro de 2015.

CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Foodborne Disease**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html>> Acesso em 29 jan.2015.

CHANG, J.-MEL.; FANG, J. T. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. **Food microbiology**, v.24, n.8, p.741-751, 2007.

CHANPRASARTSUK, O., PRAKITCHAIWATTANA, C., SANGUANDEEKUL.; et al. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n.3, p. 7500-7509, 2010

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.5, n. 4, p. 169-186, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard-Seventh Edition M07-A7, 2006.

COUNCIL OF EUROPE, 2000. **Natural sources of flavourings**, vol. I, Ed 1, Council of Europe.

CRESTANI, M.; et al. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, v.40, n.6, p.1473-1483, 2010.

CUNHA, G.A.P. **Paraíba e Bahia aderem à produção integrada de abacaxi**, 2006. Disponível em: <www.agrosolution.com.br>. Acesso em: 30 Jan 2015

CUNHA, J. **Fruticultura: o Nordeste em transformação**. Rio Bravo Fronteiras, 2009. Disponível em: <http://www.riobravo.com.br/acervo/Documents/Fronteiras/Rio_Bravo_Fronteiras_Nov_09.pdf>. Acesso em: 22 de janeiro. 2013.

DAL POZZO, M.; et al. Antimicrobial activities of essential oils extracted from spices against *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

DER VEEN, S.V.; ABEE, T. Importance of sig^b for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.23, p.7854-7860, 2010.

DERAL-Departamento de Economia Rural Fruticultura - **Análise da Conjuntura Agropecuária** Dezembro de 2012.

DEVLEIGHIERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n.3, p.703–714, 2004.

DI CAGNO, R.; et al. Use of autochthonous starters to ferment red and yellow peppers (*Capsicum annum* L.) to be stored at room temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n.2, p. 108-116, 2009.

DI CAGNO, R.; et al. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Food Microbiology**, v. 27, n.3, p.381-389, 2010.

DI CAGNO, R.; et al. 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.

DI CAGNO, R.; et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v.33, n.1, p. 1-10, 2013.

DOYLE, B. M. P., BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. 2001. **Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers: Washington, 2ed, 2001, p.352.**

DUARTE, T.L.; LUNEC, J. 2005. Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**, v.39, n.7, p.671-686, 2005.

ESPINA, L.; et al. 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. p.896-902, 2011.

ESPINA, L., GARCÍA-GONZALO, D., PAGÁN, R. Impact of Essential Oils on the Taste Acceptance of Tomato Juice, Vegetable Soup, or Poultry Burgers. **Journal of Food Science**, v. 79, n.8, p.1575-1583, 2014

FACHIELLO, J. C.; et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p. 109-120, 2011.

FAI, C.A.A.; et al. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Revista de Ciência e Saúde Coletiva**, v.16, n.2, p.657-662, 2011.

FANDOHAN, P.; et al. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n.7, p.2493–2497, 2008.

FERNANDES, M. S.; DANTAS, J. L. L. Câmara setorial da cadeia produtiva da fruticultura. In: VILELA, D. (org); ARAUJO, P. M. M. **Contribuição das câmaras setoriais e temáticas à formulação de políticas públicas e privadas para do agronegócio**. Brasília: MAPA/SE/CGAC, 2006. 496 p.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial**. Campinas: ITAL, 2002. 116 p.

FIORI, C.Z.; OLIVEIRA, V.R. Avaliação de frutas e sucos tratados termicamente em forno de microondas (fm): uma alternativa para minimizar riscos microbiológicos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.4, p.365-374, 2013.

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAO Statistical Yearbook –Agriculture total**, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut fruits and vegetables**, 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ProducePlantProducts/ucm064458.htm#ch1>> Acesso em: 29 jan. 2015.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2013, p.239.

FRANCO, B.D.G de M.; LANDGRAF, M. Microorganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: _____. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo- SP: Atheneu, 2008, p.175.

FRANK, J. F. Microbial attachment to food and food contact surfaces. **Advance Food Nutrition Research**, v.43, n.7, p. 320-370, 2001.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 22-26, 2003.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: A foodborne that knows to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n. 1, p.1-15, 2007.

Gastroenterology Week. BioSpec Global Solutions Inc., is developing a new bio system AMUDOS filter for the detection of *E.coli*, *Salmonella*, *Listeria* and *Pseudomonas* for food industry.", 2010. Academic OneFile. Disponível em:<http://go.galegroup.com/ps/i.do?id=GALE%7CA229124253&v=2.1&u=capes&it=r&p=ONE&sw=w&asid=83d61d163fb7e0af575895e18888feaf> > Acesso em: 02 fev. 2015.

GUERRA, M.J.M.; BADELL, J.B., ALBAJÉS, A.R.R., et al. Toxicologic acute evaluation of the fluid extracts 30 and 80 por ciento of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (lemongrass). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.5, n.3, p.97-101, 2000.

GUIMARAES, L. G. L.; et al. **Química Nova**, v.31, n.6, p.1476-1480, 2008.

GUTIERREZ, J, C.; BARRY-RYAN, P, BOURK. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 91-97, 2008.

HAYS, W.P.; HAYS, R.V. The pineapple. In: _____. **Foods the Indians gave us**. New York: Ives Washburn, 1973. p.40-47.

HERISGTAD, B., HAMILTON, M., HEERSINK, J., 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, 44, 121-129.

H.I. OWAMAH.; ALFA, H.I.; DAHUNSI, S.O. Optimization of biogas from chicken droppings with *Cymbopogon citratus* **Renewable Energy**, v. 68, n.2, p.366-371, 2014.

HONG YANG, C.; et al. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Ecology**, v. 98, n. 7, p. 3889–3894, 2000.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in foods preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v.3, n.5, p. 12-18, 2012.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (2002-2003)**

Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicao_de_vida/pof/2002/pof2002.pdf Acesso em 21 de janeiro de 2015.

_____. **Produção Agrícola Mundial: Culturas Temporárias e Permanentes- 2010.**

Disponível

em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf Acesso em 13 de janeiro de 2015.

ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

Microorganisms in Foods: microbial testing Ecology of Foods. New York: Academic Press, v.2, cap, 6, 1980. 6235p.

IRITH WIEGAND, I., HILPERT, K., W.; HANCOCK, R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, p. 163-175, 2008.

ISMAN, M.B.; WILSON, J.A.; BRADBURY, R. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n.2, p. 82-87, 2008.

JAY, J. M.. Listerioses de Origem Alimentar. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2005, p.711.

KHAN, M.S.A.; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, n.4, p.416-423, 2012

KIM, H.J.; CHO, J.C. Simple and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in fruit juice by real-time PCR without enrichment culture. **Food Control**, v.21, n.10, p.1419-1423, 2010.

KRAUSE, W.; et al. Tamanho ótimo de amostra para avaliação de caracteres de frutos de abacaxizeiro em experimentos com adubação usando parcelas grandes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n. 1, p. 183-190, 2013.

LANGEVELED, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 3, p.76-94, 2014.

LIOLIOS, C. C.; et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 112, n. 8, p. 77-83, 2009.

LU, H.J.; BREIDT, F.; DIAZ, P.I. Development of an effective treatment for a 5-Log reduction of *Escherichia coli* in refrigerated pickle products. **Journal of Food Science**, v.78, n.2, p.264-269, 2013.

LU, Z.; BRUDT, F. *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage Φ 241 isolated from an industrial cucumber fermentation at high acidity and salinity. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.67, p.1-10, 2015.

MARTINS, F.P.; et al. Conservação pós-colheita de abacaxi ‘Pérola’ produzida em sistemas convencional e integrada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p.695-703, 2012.

McMAHON, M. A. S.; TUNNEY, M. M.; MOORE, J. E.; BLAIR, I. S.; GILPIN, D. F.; McDOWELL, D. A. Changes in antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus* phylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 263-268, 2008.

MELENETTI, L. M. M.; SAMPAIO, A.C.;RUGGIERO,C. Avanços na fruticultura no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, n.1, p.73-75, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Brasil e Agronegócio**. Brasília - DF, 2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**, 2010. Disponível em : <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf> Acesso em 29 jan.2015.

MIRGHANI, M. M.; LIYANA, Y.; PARVEEN, J. Bioactivity analysis of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **International Food Research**, v. 19, n.2, p.569-575, 2012.

MOSQUEDA-MELGAR, J.; RAYBAUDI-MASSILIA, R.M.; MARTÍN-BELLOSO, O. Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. **Food and Bioproducts Processing**, v.90, p.205-214, 2012.

NAIK, M.I., et al. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.3, n.7, p.535-538, 2010.

NGUEFACK, J; BUDDE, BB; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n. 5, p.394-400, 2004.

NIZAR Y. SAAD, N.Y.; MULLER, D.C.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavor and Fragrance Journal**, v.28, n.5, p. 269-279, 2013.

NOGUEIRA, S. F. **Teores de ácido l-ascórbico em frutas e sua estabilidade em sucos**. 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias)- Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo do Goytacazes, 2011.

OWAMAH, H.I.; ALFA, B.M.I.; DAHUNSI, C. S.O. Optimization of biogas from chicken droppings with *Cymbopogon citratus*. **Renewable Energy**, v.68, n.5, p.366-371, 2014.

PALOMINO, J.C.; et al. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PINHEIRO, M.A., et al. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.98-103, 2006.

PEREIRA, A.A., CARDOSO, M.G., ABREU, L.R. et al. Chemical characterization and inhibitory effect of essential oils on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Revista Ciências Agrotecnológicas*, v.32, n.3, p.887-939, 2008.

PULIDO, R.P., et al. Fermentation of caper products. In: HUI, Y.H. (Ed.), *Handbook of Plant-based Fermented*. **Food and Beverage Technology**, second ed. CRC Press, Boca Raton, USA, p. 201-208. 2012.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M.A. Status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, n.3, p.250-264, 2014.

RAY, B. **Fundamental food microbiology**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Pres LLC, 2004. 608p.

RAYBAUDI-MASSILIA, R.M.; JONATHAN MOSQUEDA-MELGAR, J.; MARTÍN-BELLOSO, O. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in Fruit Juices. **Journal of Food Protection**, v.69, n.7, p.1579-1586, 2006.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; et al. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juice by traditional and natural antimicrobials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.8, n. 3, p.157-180, 2009.

ROSA, M. R. M.; MELGAR, J. M.; BELLOSO, O. M. Antimicrobial Activity of Essential Oils on *Salmonella enteritidis*, *Escheichia coli*, and *Listeria innocua* in Fruit Juices. **Journal of Food Protection**, v. 69, n.7, p. 1579-1586, 2006.

ROSINI, G.; FEDERICI, F.; MARTINI, A. Yeast flora of grape berries during ripening. **Microbial Ecology**, v. 8, n.2, p. 83-89, 1982.

SAAD, N.Y.; MULLER, C.D.; LOBESTIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v.28, n.3, p.366-371, 2013.

SALDANHA, C.A., AVANCINI, C.A.M., WIEST, J.M. Antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. -*Compositae* (Chinchilho) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Brazilian Journal and Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.6, p.143-150, 2000.

SANTOS, J. A. N., et al. **Agroindústria de alimentos de frutas e hortaliças no Nordeste e demais áreas de atuação do BNB**: desempenho recente e possibilidades de políticas. Banco do Nordeste do Brasil, 2008, 324.p.

SANTOS, E.C., et al **Anuário Brasileiro de Fruticultura**. São Paulo: Ed. Gazeta, 2008.p.136.

SANTOS, M.C.A.; SILVA, T. **Avaliação do mercado de frutas e hortaliças embaladas, minimamente processadas, orgânicas e desidratadas na capital de Minas Gerais**: Estudo

técnico realizado pela CEASAMINAS-Unidade Grande BH. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento, 2010, 113p.

SHAMSUDIN, R.; et al. Rheological properties of ultraviolet-irradiated and thermally pasteurized Yankee pineapple juice. **Journal Food Engineering**, v. 116, n.2, p.548-553, 2013.

SHANKAR RAUT, J.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 3, p. 250-264, 2014.

SHIGE HARU, I.; TOSHIO, T.; HIDEYO, Y. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, n.5, p.565-573, 2001.

SILVA, G.B.; et al. Laranja-da-terra: fruta cítrica potencial para o Piauí. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 557-562, 2010.

SILVA, L. M.; et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.143, n. 15, p.398-404, 2014.

SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.352, 359, 2006.

SILVA, P.A.R.; et al. Fruits and Vegetables: Fruit and Vegetable Juices. p.992-999, 2014.

SINHA, M., et al. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.68,n.7,p.71-77, 2014.

SIVAKUMAR,D.; BAUTISTA-BAÑOS, S. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. **Crop Protection**, v.64, n.4, p.27-37,2014.

SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; VICCINI, L.F., 2010. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.2, p.305-311, 2010.

SOUTO, R. F. Conservação pós-colheita de abacaxi ‘Pérola’ colhido no estágio de maturação “pintado” associando-se refrigeração e atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 24-28, 2004

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M. ; LIMA, E. O. . Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n.3, p. 527-532, 2006.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory Evaluation Practices**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993. 295p.

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, n.9, p.1199-1218, 2010

TOFANELLI, M.B.S.; et al. Mercado de frutas frescas no município de Mineiros-GO. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.2, p.282-286, 2007.

TONDO, E.C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. 2ª ed. Ed. Sulina, Porto Alegre, 2014. 263 p.

TRIPATHI, R.; KAUSHIK, D.;TRIPATHI, A., et al. 2006. Acute and subacute toxicity studies on vetiver oil in rats. **FABAD- Journal Pharmaceutical Sciences**, v.31, n.3, p.71-77, 2006.

TROMBETTA, D.; et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes mechanisms of antibacterial action of three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n.6, p. 2474–2478, 2005.

TUREK,C.; STINTZING, F. Stability of Essential oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, n. 1, p.40-52, 2013.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **Complementary and Alternative Medicine**, v.10, n. 65, p.2-11, 2010.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R.D. Antioxidant-induced stress. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, n.2, p.2091-2109, 2012

UKUKU, D. O.; SAPERS, G. M. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella stanley* attached to the surface of Cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 9, p.1286-1291, 2001.

WIEGAND, L.; HILPERT, K.; HANCOCK, R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocol**, v.3, n.2, p.163-175, 2008.

World Health Organization (WHO). **Food safety and foodborne illness**. Geneva, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2015.

_____. Integrated prevention of non-communicable diseases. Executive Board, 113 th Session. Draft global strategy on diet, physical activity and health.. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/EB113/eb11344a1.pdf> Acesso em 23 de Janeiro de 2015.

APÊNDICE A-
ARTIGO ORIGINAL

Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. essential oil in pineapple juice

Running title: Bacterial inactivation lemongrass essential oil

Caroline Junqueira Barcellos Leite ¹, Jossana Pereira de Sousa ¹, José Alberto da Costa Medeiros ¹, Maria Lúcia da Conceição ¹, Vivyanne dos Santos Falcão-Silva ², Evandro Leite de Souza ^{1*}

¹ *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

² *Laboratory of Geneticis of Microorganisms, Department of Molecular Biology, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

* Author for correspondence: Evandro Leite de Souza
Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
e-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br
Phone: + 55 83 3216 7807; Fax number: + 55 83 3216 7094

Abstract

In the present study, the efficacy of *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. essential oil (CCEO) to provoke a 5-log ufc/mL (5 log) inactivation in a mix composite of *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) juice (7 °C) was assessed. Moreover, the effects of CCEO on the survival of native microflora and the physicochemical and sensory quality properties of pineapple juice were assessed. The minimum inhibitory concentration (MIC) of CCEO was 5 µL/mL against the composite mix

examined. For *L. monocytogenes* and *E. coli* inoculated in juice containing CCEO (5, 2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$), a ≥ 5 -log reduction was detected after 15 min of exposure. This same result was obtained for *S. Enteritidis* incubated alone in pineapple juice containing CCEO at 5 and 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Overall, *S. Enteritidis* was the most resistant and *L. monocytogenes* was the least sensitive to CCEO. After 2 h, CCEO (5, 2.5, and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) induced a ≥ 5 -log reduction in yeasts, molds and mesophilic and lactic acid bacteria, which naturally occur in pineapple juice. The physicochemical properties (pH, titratable acidic and soluble solids) of pineapple juice containing CCEO (2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were maintained. Unsatisfactory changes in taste and aftertaste were observed in juices containing CCEO (2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$). These results suggest CCEO as a promising antimicrobial compound to ensure the safety of pineapple juice, although a negative impact on taste was observed. Therefore, further studies are needed to determine the balance between microbial safety and taste acceptability of this product.

Keywords: lemongrass, *Ananas comosus* (L.) Merrill, juice, pathogenic bacteria, antibacterial effects

1.Introduction

Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) fruits and industrial by-products have a strong flavor and intense aroma and are used for fresh consumption and the production of a variety of industrial derived products, including juices (Di Cagno et al., 2010; Krause et al., 2013). Pineapple fruit is a good source of fibers, vitamins, minerals and phenolic compounds, with highlighted antioxidant capacities and potential health benefits (Couto et al., 2011). Because pineapple fruits are grown in the ground, it is virtually impossible to prevent microbial contamination of the rind of these fruits. Thus, when pineapple fruits with contaminated rinds

are cut, different pathogenic and spoiling microorganisms can be transferred to the pulp (edible part) and consequently to juice during or after extraction (Mosqueda-Melgar et al., 2008).

Pineapple juice could be considered safe from pathogenic bacteria because of intrinsic characteristics (low pH and high acidity) that create a hostile environment for bacterial survival. However, reports of the incidence, survival and growth of pathogenic bacteria, such as *E. coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*, in high-acidic fruits, such as apples, oranges, cranberries and lemon juices, have changed the belief that fruit juices are of small concern for harboring pathogenic bacteria (Nogueira et al., 2003; Mosqueda-Melgar et al., 2008; Duan and Zhao, 2009). Moreover, several outbreaks of *E. coli* and *Salmonella* associated with the consumption of unpasteurized apple and orange juices have been reported (Krause et al., 2001; Han and Linton, 2004). Although *L. monocytogenes* has not often been implicated in outbreaks associated with unpasteurized fruit juices (Enache and Chen, 2007), this bacterium has previously been isolated from apple and raspberry juices (Flessa et al., 2005; Sung et al., 2014). Because of the acidity of pineapple juice (pH 3 - 4), similar to apple and orange juice, the potential to harbor pathogenic bacteria and cause foodborne illness remains a major concern.

Thus, issues surrounding the safety of unpasteurized fruit juices have been of considerable interest to industry and public health. The Food and Drug Administration (FDA) proposed a hazard analysis and critical control point (HACCP) regulation that includes a performance criterion for juice safety, commonly referred to as the juice HACCP (FDA, 2001). The standard regulation requires juice processors to achieve a 5-log reduction of target microorganism (s) of public health significance when making juice, but this regulation does not require a specific method to achieve this inactivation level. Currently, pasteurization remains the dominant preservation procedure for eliminating pathogenic and spoiling

organisms from juices. However, the heating used in pasteurization can cause a significant loss of nutrients (primarily vitamins and minerals), generating undesirable changes in the fresh color and taste of juices (Lado and Yousef, 2002; Elez-Martínez et al., 2006). The juice industry typically adds chemical preservatives to control bacteria in fruit juices (Espina et al., 2012); however, consumers are concerned about the potential risks of foods contaminated with chemicals and pathogenic microorganisms (Sivakuma and Bautista-Baños, 2014). Thus, consumers have demanded safer, fresher and healthier foods with no or few chemical preservatives, creating a market demand for natural, non-thermal and feasible technologies for ensuring the microbial safety of juices (Kapoor et al., 2009).

Innovative non-thermal technologies, such as pulsed-electric fields and high hydrostatic pressure, have been successfully applied to control pathogenic bacteria in juices (Espina et al., 2011; Espina et al., 2012). Although these technologies offer some advantages in relation to conventional thermal processes, the high initial costs associated with setting up these systems represent a major obstacle for the wide application of these methods in the fruit juice processing industry (Duan and Zhao, 2009). In this context, essential oils (EOs) have received increasing attention for potential as inhibitors of microorganisms in fruit juices (Raybaudi-Massilia et al., 2006). The EOs are Generally Recognized as Safe (GRAS) at doses typically used in foods (Burt, 2004) and have been approved through the FDA as flavoring agents in foods and beverages (FDA, 2009). The essential oil (EO) obtained from *Cymbopogon citratus* (Dc. Ex Nees) - lemongrass (CCEO) showed wide-spectrum antimicrobial activity, including the inhibition of pathogenic and spoiling juice-related microorganisms (Suhr and Nielsen, 2003; Raybaudi-Massilia et al., 2006; Raybaudi-Massilia et al., 2009; Naik et al., 2010).

Particularly in Brazil, a variety of pineapple products (such as frozen pulps, unpasteurized juices, ready-to-eat fruit-mix salads and minimally processed slices) containing

grinded *C. citratus* leaves are available in the market. These products are well accepted and regarded as typical value-added products because of the distinct but pleasant “lemon-like” refreshing taste of these fruit products. Thus, pineapple juice could represent a suitable food matrix to exploit the antimicrobial properties of *C. citratus* essential oils without causing dramatic changes in the sensory acceptance of this product.

In the present study, we assessed the efficacy of CCEO to induce a ≥ 5 -log reduction of a mixed composite containing the pathogenic bacteria *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. enterica* serovar Enteritidis in pineapple juice. The effects of CCEO on the survival of native microflora and on the physicochemical and sensory quality parameters of pineapple juice were assessed.

2. Materials and methods

2.1 CCEO and pineapple fruits

The CCEO (Batch 0061) was obtained from Laszlo Aromatherapy Ltd (Belo Horizonte, Brazil). The CCEO solutions were prepared in brain heart infusion (BHI; Himedia, India) at varying concentrations (80 – 0.312 $\mu\text{L}/\text{mL}$) using Tween 80 (0.5%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) as an emulsifier. At the highest assayed concentration (0.5%; v/v), Tween 80 presented no inhibitory effect against the test organisms.

The pineapples (*Ananas comosus* L. Merrill) were purchased in the commercial maturation stage from a local wholesale distributor and selected for uniformity in size, form, appearance and the absence of mechanical injuries or visible infections. For pineapple juice preparation, the fruits were surface-disinfected after 15-min immersion in a sodium hypochlorite solution (1 mL/100 mL, pH 7.2 adjusted using 1 M NaOH), washed with sterile distilled water and dried for 1 h in a safety cabinet. Thus, the fruits were aseptically peeled, chopped and mixed with distilled water (1:10 rate) using a domestic blender. The mixture was

filtered using a triple-cheesecloth layer and sterilized by autoclaving (121 °C, 1.1 atm, for 15 min). The juice was stored in 50-mL aliquots at - 20 °C, and when required, an aliquot was thawed under refrigeration (7 ± 1 °C) and used for subsequent assays.

The juice samples used in assays of the inhibitory effects on naturally occurring microbiota were not submitted to autoclaving and prepared immediately prior to analysis, while the juice samples were submitted to physicochemical analysis after autoclaving (previous experiments revealed that the assessed physicochemical parameters in pineapple juice were not changed after autoclaving). The non-inoculated juice samples used in sensory analysis were prepared at 24 h before assessing the acceptance, and the results of the microbiological analysis revealed the satisfactory microbiological quality of these juice samples according to current Brazilian legislation (Brasil, 2003).

2.2 Test strains and composite preparation

The *L. monocytogenes* (ATCC7644), *Escherichia coli* (UFPEDA 224) and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (UFPE 414) were obtained from the Collection of Microorganisms, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco (Recife, Brazil). The stock cultures were maintained in BHI broth + glycerol (15 g/100 mL) at - 20 °C. Each strain was grown in BHI broth at 37 °C for 20 – 24 h (stationary growth phase), harvested through centrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution (0.85 g/100 mL) and re-suspended in sterile saline solution to obtain cell suspensions at which the OD reading at 660 nm (OD_{660}) ranged from 0.08 to 0.13 to provide viable cell counts of approximately 10^8 counting forming units per milliliter (cfu/mL) (Wiegand et al., 2008).

The mix composite of the three strains tested was obtained by mixing the obtained bacterial suspensions at a ratio of 1: 1: 1 for a maximum of 15 min after the preparation of

each pure suspension (final count of each strain of approximately 8 log cfu/mL). This level of inoculum was used because bacterial survival studies in juice require the use of high numbers of cells in the inoculum for the measurement of several log reductions (≥ 5 -log reduction) in colony forming units per milliliter (cfu/mL). Still, this study was performed using stationary phase cells because bacterial resistance to food preservation technologies is typically at a maximum at this growth stage (Mañas and Pagán, 2005).

2.3 The identification of CCEO constituents

The constituents in CCEO were identified through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS; CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu). Analysis through GC-MS was performed under the following conditions: a 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. The spectra bank of GC/MS, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database (Version 1.7) was used to identify the individual essential oil constituents. The quantification of the constituents was obtained after normalizing the areas of each detected constituent, expressed as a percentage area (%).

2.4 Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CCEO

A modified microtiter plate assay was used to determine the MIC of CCEO according to the standard method of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006), with minor modifications regarding the use of a stain to detect bacterial growth/survival. Approximately 50 μ L of CCEO solution (40 – 0.312 μ L/mL) was dispensed into each well of a 96-well microplate. Subsequently, 50 μ L of bacterial suspension were added to each well (final viable cells count of approximately 10^7 cfu/mL). The microplate was loosely wrapped

with cling wrap to prevent bacterial dehydration and CCEO volatilization. Each plate included control (without CCEO), inoculated (positive control) or uninoculated (negative control) samples. The system was statically incubated at 37 °C for 24 h. Subsequently, a 30- μ L aliquot of resazurin (0.01 g/100 L, w/v) (Inlab, Brazil), prepared in aqueous solution, was added to each well. The color changes were visually assessed after 20 min at 37 °C. Bacterial growth was indicated as color changes from purple to pink (or colorless). The MIC values were confirmed as the lowest concentration of CCEO capable of inhibiting bacterial growth.

2.5 Effects of CCEO on survival of bacterial strains in pineapple juice

The effects of different CCEO concentrations (5, 2.5, 1.25, and 0.6 μ L/mL) on the survival of the bacterial mix composite in pineapple juice after refrigeration for 24 h were assessed using the viable cell count method. Initially, 150 μ L of the tested bacterial mix composite was inoculated into 5850 μ L of separated juice samples containing CCEO at the desired final concentrations. The different systems (final viable cell counts of approximately 10^7 cfu/mL) were gently hand-shaken for 30 s, and subsequently incubated at 7 °C. At different exposure times (15, 30 and 45 min; 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h), a 20 μ L-aliquot was obtained from each system to directly inoculate (via microdrop technique - Herigstad et al., 2001) onto selective agar: eosin-methylene blue agar (Himedia, India) for *E. coli*, *Listeria* selective agar + *Listeria* Selective Supplement II (Himedia, India) for *L. monocytogenes* and *Salmonella – Shigella* agar (Himedia, India) for *S. Enteritidis* (Azêredo et al., 2011; Sousa et al., 2012). In parallel, 100- μ L aliquots of each system were serially diluted in sterile saline solution, and subsequently 20 μ L of each dilution was inoculated onto the same selective medium for each bacteria. Control juices without the addition of CCEO were similarly assayed. The plates were incubated at 37 °C for 24 - 48 h. Plates inoculated with aliquots collected from juice samples containing CCEO were incubated for an additional 24 h at

adequate temperatures compared with the samples collected from control juice. The results are expressed as duration of exposure to each tested concentration of CCEO to establish a ≥ 5 -log ufc/mL reduction in initial viable cell counts (cfu/mL at time zero) of each of the tested strains comprising the mix composite $\log N_0-N$, where N and N_0 were the initial count and count after incubation for indicated times at 7 °C, respectively.

The detection of low numbers of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis* was verified in each experiment by adding sterile saline in three juice samples inoculated with the appropriate dilution of each test strain to achieve counts of approximately 10^1 , 10^2 , 10^3 and 10^4 cfu/mL. Samples were vigorously mixed for 30 s, and subsequently plated onto selective agar as described above. The sample inoculated with the lowest level of bacterial cells that demonstrated growth (detection of cfu) determined the limit of the detection of the method. The detection limit of viable cells counts was 2 log cfu/mL for all strains tested.

2.6 Effects of CCEO on survival of native microflora in pineapple juice

The effect of OECC at different concentrations (5, 2.5, 1.25 and 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) on the survival of some groups of microorganisms forming the naturally occurring microbiota of fresh (non-sterilized) pineapple juice was evaluated at different intervals after refrigeration for 72 h. To this end, 6000 μL -aliquots of fresh pineapple juice samples containing the CCEO at the different desired concentrations were aseptically dispensed into sterile flasks, followed by static incubation at 7 °C. At different exposure times (15, 30, 45 and 60 min; 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h), a 20 μL -aliquot of each flask was directly inoculation (via microdrop technique - Herigstad et al., 2001) on plate count agar (Himedia, India) to count total mesophilic aerobic bacteria, agar Man-Rogosa Sharpe (Himedia, India) for count lactic acid bacteria and Sabouraud dextrose agar (Himedia, India) to count molds and yeasts (Himedia, India). In parallel, 100- μL aliquot of each system was also serially diluted in sterile saline solution and

subsequently 20 μL of each dilution was similarly inoculated on the same agar types. The plates were incubated for 24 - 48 h at 37 °C for mesophilic and lactic acid bacteria, and 48 – 72 h at 25 °C for molds and yeasts. Plates inoculated with aliquots obtained from fruit juices containing CCEO were incubated for an additional 24 h at an adequate temperature compared with samples collected from control juices. The results are expressed as duration of exposure to each tested concentration of CCEO to establish a ≥ 5 -log ufc/mL reduction (≥ 5 -log reduction) in initial viable cells counts (cfu/mL at time zero) of each monitored microorganism group $\log N_0$ -N, where N and N_0 were the initial count and count after incubation for the indicated time at 7 °C, respectively. The detection limit for this method was 2 log ufc/mL for all monitored microbial groups.

2.7 Analysis of physicochemical and sensory parameters of pineapple juice

Samples of pineapple juice containing the CCEO (0.25 and 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were assessed for some physico-chemical quality parameters at different intervals of storage at 7°C (baseline – just after the addition of the essential oil – termed 0 and 72 h). The titratable acidity was determined using phenolphthalein as an indicator with 0.1 N NaOH, and the results were expressed as mmol H^+ /100 g of juice, pH values were determined using a digital potentiometer, and the soluble solids content, expressed as °Brix, was determined using a digital refractometer (Model HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil)(AOAC, 2006).

Sensory evaluation was performed via acceptance test using 60 members (20 – 35 years old) pre-selected according to interests and pineapple juice consuming habits. Panelists worked in individual booths with controlled conditions for temperature and lighting. Each panelist received three juice samples containing the different concentrations of CCEO tested (0.25 and 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$). The CCEO was incorporated in juice samples at 24 h (and refrigerated at 7 °C) prior to the sensory test. Samples of juice without the CCEO were tested

as controls. The different juice samples were served in 30-mL aliquots of white disposable cups coded with a randomized three-digit number. The samples were served simultaneously using a blind method of random sequence, immediately after removing from refrigerator storage. The panelists were asked to use low-salt crackers and water to clean their palates between the assessed samples. The acceptance of appearance, odor, viscosity, taste, aftertaste and overall acceptance were evaluated on a 9-point hedonic scale, ranging from 1 (dislike very much) to 9 (like very much) (Stone and Sidel, 1993).

2.8 Reproducibility and statistics

All assays were performed in triplicate in three independent experiments (replicates), and the results are expressed as average of the tests. For assays to determine MIC values, the results were expressed as modal values because the MIC values were the same in all repetitions. For data of physicochemical and sensory parameters, statistical analyzes were performed to determine significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments using ANOVA, followed by Tukey's post hoc test using the computational software Graphpad Prism 6.0.

3. Results

3.1 GC-MS analysis of CCEO

The GC-MS analysis of CCEO showed the presence of seven different constituents in amounts higher than one percent of the EO total mass (Table 1). The monoterpenes geranial (β -citral isomer) (46.16%) and neral (α -citral isomer) (31.74%) were identified as the major constituents of CCEO. Other compounds, such as geranyl acetate (4.34%) and caryophyllene (2.02%) were detected in lower amounts.

3.2 Antimicrobial assays

The MIC value of CCEO was 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ against the composite mix containing *E. coli* UFEPEDA 224 (*E. coli*), *L. monocytogenes* ATCC 7644 (*L. monocytogenes*) and *S. Enteritidis* UFEPEDA 414 (*S. Enteritidis*) (data not shown). The incorporation of CCEO in pineapple juice at all tested concentrations (2.5, 1.25 and 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$) caused a sharp decrease in *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*. For *L. monocytogenes* and *E. coli* inoculated in juice containing CCEO at 5, 2.5 or 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, a ≥ 5 -log reduction in survivors was detected after 15 min of exposure. This same reduction (after 15 min) was observed for *S. Enteritidis* alone when inoculated in juice containing CCEO at 5 or 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. A 6-fold longer exposure time (1 h) was needed for a ≥ 5 -log reduction of *S. Enteritidis* in juice containing CCEO at 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ compared with the other tested bacteria. In juice samples containing CCEO at 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, ≥ 5 -log reductions of *E. coli* and *L. monocytogenes* were observed after 1 and 5 h, respectively, while 12 h incubation was needed to achieve a similar reduction of *S. Enteritidis*. Since a ≥ 5 -log reduction was observed, no survivors were detected at longer the assessed time intervals.

In juice samples without CCEO, only *L. monocytogenes* presented a ≥ 5 -log reduction as detected after 24 h of cultivation. In the same systems (juice), a 3.3- and 1.29-log reduction was observed for *E. coli* and *S. Enteritidis*, respectively, after 24 h of cultivation.

Consistent with the results observed in testing bacterial inactivation of the mixed composite, the CCEO (5, 2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) caused a fast and sharp decrease in the numbers of native microflora in pineapple juice samples. For mesophilic bacteria and lactic acid bacteria in juice containing CCEO at 5, 2.5 or 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, a ≥ 5 -log reduction was detected after 45 min of exposure. In the same system, molds and yeasts presented a ≥ 5 -log reduction only after 2 h of exposure. However, ≥ 5 log reductions were not detected for all

monitored microorganisms in juice containing CCEO at 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$, and in control juice (without CCEO). Moreover, in control juice, 0.5-, 0.3- and 0.5-log reductions were observed for mesophilic bacteria, lactic acid bacteria and molds and yeasts, respectively, after incubation for 24 h (initial counts were consistently in the range of 6.0 and 6.5 log cfu/mL).

3.3 Physico-chemical and sensory analysis of pineapple juice

Pineapple juice samples supplemented with or without CCEO (2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were evaluated for pH, titratable acidity and soluble solids ($^{\circ}$ Brix) immediately after the addition of EO and after refrigeration for 24 h. The fruit juice samples supplemented with or without CCEO presented no difference ($p > 0.05$) in the evaluated physico-chemical parameters at the assessed time intervals. Overall, the addition of CCEO preserved the assessed physico-chemical properties (quality) of juice samples.

The addition of CCEO at 2.5 and 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ did not affect ($p > 0.05$) the appearance, odor and viscosity of apple juice after refrigeration for 24 h (Table 4). Otherwise, both tested CCEO concentrations negatively affected the taste and aftertaste of pineapple juice. Samples of pineapple juice without CCEO received the highest scores ($p \leq 0.05$) for taste, residual taste and overall acceptance. Juice containing CCEO, at both tested concentrations, exhibited similar scores ($p > 0.05$) for odor, appearance and color compared with control samples (without CCEO). In addition, samples containing CCEO at both tested concentrations did not differ ($p > 0.05$) in scores for all assessed sensory attributes.

The mean scores for appearance, odor and viscosity fell between “neither like/nor dislike” and “slightly like” on the hedonic scale for samples of pineapple juice containing CCEO, while the mean scores for taste, aftertaste and overall acceptance fell always “slightly unlike”. The mean scores for all assessed sensory parameters fell “slightly like” for control juice samples.

4. Discussion

The CCEO tested in this study inhibited the growth of a mixed composite of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis* in synthetic broth. However, based on the detected MIC value (5 $\mu\text{L/mL}$), the CCEO tested could be classified as a weak bacterial inhibitor (Aligianis et al., 2001) of the target mix bacterial composite. The detected MIC value of CCEO could be intrinsically related with the individual constituents (ICs) forming this this EO, where neral (β -citral *cis*-isomer, termed citral B) and geraniol (α -citral *trans*-isomer - termed citral A) were detected as major constituents. Based on the results of previous studies, the following approximate general rank (in decreasing order of antibacterial activity) of ICs is proposed: eugenol > carvacrol/thymol/cinnamic acid > basil methyl chavicol > cinnamaldehyde > citral/geraniol (Burt, 2004), where citral is not classified as possessing the strongest antimicrobial effects.

The presence of high amounts of oxygenated monoterpenes in CCEO (77.90%), particularly the citral compounds neral and geraniol (terpene aldehydes), could be responsible for the inhibitory effects against the tested bacterial strains. Researchers have proposed that antimicrobial action mode of EOs without phenolic compounds as major ICs, such as CCEO, could be associated with membrane disruption of target cells through lipophilic compounds, primarily terpene hydrocarbons (e.g., caryophyllene, α -pinene, *p*-cymene and γ -terpinene) (Mendoza-Yepes et al., 1997). These terpene hydrocarbons induce swelling of bacterial cell membrane to facilitate the transportation of citral into cell (Sivakumar and Bautista-Baños, 2014), where these compound promote dramatic effects on cell envelope, proton motive force and intracellular ATP content (Somolinos et al., 2009).

Considering the knowledge that EOs could negatively affect the sensory acceptance of juices (Mosqueda-Melgar et al., 2012), the assays of bacterial inactivation were performed

using pineapple juice samples containing the CCEO at concentrations similar to the MIC (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and at concentrations as low as the 1/2 MIC (2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), 1/4 MIC (1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and 1/8 MIC (0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$). This approach was used to detect the lowest assayed CCEO concentrations capable of achieve the regulatory 5-log reduction of target pathogenic bacteria. Notably, CCEO was effective to cause 5-log decreases in *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis* at all tested concentration in pineapple juice. These effects occurred at a maximum exposure time of 1 h when the EO was incorporated in juices at 5, 2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Although some juices have previously been characterized as hostile toward *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella*, causing at least 5-log reduction at a maximum period of 24 h in refrigerated storage (Liao et al., 2007; Patil et al., 2009), only *L. monocytogenes* showed this reduction in pineapple juice samples without CCEO after incubation for 24 h.

These results of the rapid and steady inactivation effects of CCEO in pineapple juice are surprising considering the high MIC values detected to this EO in synthetic media. However, the intrinsic characteristics of low pH and high acidity of pineapple juice probably contributed to these inhibitory effects due to the increased sensitivity of bacteria to EOs at low pH values (mostly below pH 5.5 - as found in pineapple juice) (Gutierrez et al., 2008; Gutierrez et al., 2009). This increase of the inhibitory effects of EOs at low pH values has previously been cited as a consequence of increase in the hydrophobicity of EOs, which provides easier dissolution of individual constituents in the lipids of target bacteria cell membrane (Juven et al., 1994). Still, the findings of a previous study confirmed that high °Brix levels and some naturally occurring compounds (e.g., phenolics) might also play an important role in the bactericidal effects of juices (Enache and Chen, 2007). Thus, the intrinsic characteristics (°Brix and phenolics content) in pineapple juice might also induce the increased sensitization of tested bacteria to CCEO.

In the view of the data obtained for the inactivation of test pathogenic bacteria, the ranking of bacterial sensitivity to CCEO in pineapple juice was *L. monocytogenes* > *E. coli* > *S. Enteritidis*. This result is not surprising because Gram-negative bacteria (e.g., *E. coli* and *Salmonella*) are generally less sensitive to EOs than Gram-positive bacteria (e.g., *L. monocytogenes*) (Hyldgaard et al., 2012; Mazzarrino et al., 2015). In Gram-negative bacteria, the increased tolerance reflected the presence of the outer membrane, which limits the diffusion of hydrophobic compounds, such as the individual constituents of EOs, through lipopolysaccharide coverage (Vaara, 1992).

Although the CCEO (5, 2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) was also effective to provoke a ≥ 5 -log reduction in the numbers of native microorganisms (mesophilic bacteria, lactic acid bacteria and molds and yeasts) in fresh pineapple juice, the exposure time required to achieve this reduction level were longer than those observed in inactivation assays with the tested pathogenic bacteria. The longer time needed for CCEO to induce a ≥ 5 -log reduction was detected for molds and yeasts. This result is not surprising because the low pH of the growth media imposed lower effects on fungal sensitivity to EOs compared with the reported effects on bacterial sensitivity (Tserennadmid et al., 2011). An previous study showed that lemongrass EO (1.13 and 2.25 mg/mL) caused the complete growth inhibition of some yeasts in synthetic media at exposure times varying from 8 to 24 h; however, when *Saccharomyces cerevisiae* was cultivated in fruit juice mixtures containing lemongrass EO (1.13 mg/mL), the complete growth inhibition occurred after 2 h of exposure.

Considering that CCEO at 5, 2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ provoked the rapid reduction of pathogenic bacteria and native microbiota in pineapple juice, and considering that EOs impact the sensory aspects of juices (Burt, 2004), assays for assessing the impact on the quality parameters of pineapple juice were performed using CCEO at 2.5 and 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Notably, CCEO did not alter the pH, titratable acidity and °Brix in pineapple juice samples. Moreover,

samples supplemented with or without the CCEO attended the current Brazilian standard for °Brix in fruit juices (Brasil, 2003) and were consistent with data from previous studies on the quality of pineapple juices (Martins et al., 2012; Krause et al., 2013). Although pineapple juice samples containing CCEO presented sensory acceptance for some sensory properties (appearance, odor, viscosity), noticeable unsatisfactory changes were displayed for taste, aftertaste and overall acceptance. Thus, the overall acceptance of juice samples containing CCEO was likely affected by the taste and aftertaste perceptions of the panelists. Similar findings were reported for melon and watermelon juices containing citric acid (20 µL/mL) or cinnamon bark essential oil (2 µL/mL) combined with a high-intensity pulsed electric field (Mosqueda-Melgar et al., 2008). Hence, further studies about the reduction of the negative impacts of CCEO on some sensory aspects of pineapple juice are needed, focusing on the combination of CCEO with other antimicrobial substances or procedures for potential use in juice preservation.

5. Conclusions

This study demonstrates that CCEO effectively induce a 5-log reduction of a mix composite of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis* in pineapple juice in a short exposure time. Moreover, the CCEO was effective to provoke a 5-log reduction in survivor number of naturally occurring microorganisms in fresh pineapple juice and did not affect its physicochemical properties. In contrast, CCEO negatively impacted the taste and aftertaste. Overall, the incorporation of CCEO extends the possible conditions in pineapple juices that might induce a 5-log reduction of pathogens of concern, however further studies regarding the combined use of CCEO with other non-thermal technologies are needed to establish a balance between the safety and sensory aspects in this product.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Coordination for Higher Personnel Improvements (CAPES, Brazil) for a scholarship awarded to the first author (C.J.B. Leite).

References

Aligiannis, N. E., Kalpoutzakis, S. M., Chinou, J.B., 2001. Composition and antimicrobial Activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4168-4170.

Association of Official Analytical Chemists – AOAC, 2006. The official methods of analysis of AOAC international. 18^o ed, Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 3000 p.

Azêredo, G.A., Stamford, T.L.,M.; Gomes Neto, N.J., Nunes, P.C.; Oliveira, M.E.G., Souza, E.L., 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. Food Research International,44, 1541-1548.

Brasil, 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12, 04 de setembro de 2003.

Brasil, 2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para produtos vegetais, frutas e cogumelos comestíveis. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF 23 de setembro de 2005.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard- Seventh Edition M07-A7.

Couto, D. S., Cabral, L.M. C., Matta, V.M, R., Deliz, Freitas, D.G.C., 2011. Concentration of pineapple juice by reverse osmosis: physicochemical characteristics and consumer acceptance. *Food Science and Technology*, 31, 905-910.

Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C.G., Ricciuti, P., Gobbetti, M. 2010. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, 27, 381-389.

Duan, J and Zahao, Y., 2009. Antimicrobial efficiency of essential oil and freeze-thaw treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in Strawberry juice. *Food Microbiology and Safety*, 74, 131-137.

Elez-Martínez .P., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2006. Comparative study on shelf life of orange juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatment. *Europe Food Research. Technology*, 222, 321–329.

Enanche, E, Chen, Y., 2007. Survive of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in Cranberry concentrates at different °Brix levels. *Journal of Food Protection*, 70, 2072-2077.

Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P, García, D., Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896-902.

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 of Food Microbiology*, 159, 9–16.

Flessa, S, Lusk, D. M, Harris, L.J., 2005. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 255-262.

Food and Drug Administration (FDA)., 2001. Fed register. In: Hazard analysis and critical control point (HACCP): Procedures for the safe and sanitary processing and importing

of juice: Final rule (21 CFR Part 120), Washington: Food and Drug Administration 66, 6137- 6202.

Food and Drug Administration (FDA), 2009. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. 2009. <[http:// www.accessdata.fda.gov./](http://www.accessdata.fda.gov/)>.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.

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.

Han, Y, Linton, R.H., 2004. Fate of *Escheriachia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in strawberry juice and acidified media at different pH values and temperatures. *Journal of Food Protection*, 67, 2443—2452.

Herisgtad, B., Hamilton, M., Heersink, J., 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiology Methods*, 44, 121-129.

Hyldgaard, M., Mygind, T. Meyer, R. L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-24.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 626–631.

Kapoor, I. P.S., Bandana, S., Gurdip, S., 2009. Essential oil and oleoresins of cardamom (*Amomum subulatum* roxb.) as natural food preservatives for sweet orange (*Citrus sinensis*) juice. *Journal of Food Process Engineering*, 34, 1101–1113.

Krause, G., Terzagin, R., Hammond, R., 2001. Outbreak of *Salmonella* serotype Anatum infection associated with unpasteurized orange juice. *Southern Medical Journal*, 94, 1168-1172.

Krause, W., Stork, L., Dal`Col, L., Nied, A.H., Gonçalves, R.Q., 2013. Optimum sample size for fruits characters of pineapple under fertilizations experiments using large plots. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35, 183-190.

Lado, B.H.H., Yousef, A. E., 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433-440.

Liao, H., Hu, X., Liao, X., Chen, F., Wu, J., 2007. Inactivation of *Escherichia coli* inoculated into cloudy apple juice exposed to dense phase carbon dioxide. *International Journal Food of Microbiology*, 118, 126-131.

Mañas, P., Pagán, R., 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1387-1399.

Martins, L.P., Silva, S.M., Silva, A.P., Cunha, A.P., Mendonça, R.M.N., Vilar, L.C., Mascena, J., Lacerda, J.T., 2012. Pineapple post-harvest "Pérola" produced in conventional and integrated systems. *Journal of Brazilian Fruit Crops*, 34, 695-703.

Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-Lopez, C., Sergi, A.F.M., Sigismondi, C., Compagnone, D., Serio, A., 2015. *Salmonella* Enterica and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794-803.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2008. Combination of High-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. *Food Microbiology*, 25, 479-491.

Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R.M., Martín-Belloso, O., 2012. Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. *Food and Bioprocess Processing*, 90, 205-214.

Mendoza-Yepes, M.J., Sanchez-Hidalgo, L.E., Maertens, G., Fungencio, M-I., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in spanish soft cheese. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 17, 47-55.

Naik, M.I., Fomda, B.A., Jaykumar, E., Bhat, J.A., 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 535-538.

Nogueira, M. C. L., Oyarzábal, O. A., Gombais, D. E., 2003. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in cranberry, lemon and lime juice concentrates. *Journal of Food Protection*, 66, 1637-1641.

Patil, S., Bourke, P., Frias, J.M., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* in orange juice using ozone. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 10,551-557.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., 2006. Antimicrobial activity of essential oil on *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 7, 1508-1738.

Raybaudi-Massilia, R.M., Mosqueda-Melgar, J., Martín-Belloso, O., 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juice by traditional and natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 157-180.

Sivakumar, D., Bautista-Baños, S., 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27-37...

Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., Pagán, R., 2009. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1928-1939

Sousa, J.P., Azerêdo, G.A., Tores, R.A., Vasconcelos, M.A.S., Concenição, M.L., Souza, E.L. 2012. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 154,145-151.

Stone, H.; Sidel, J.L., 1993. Affective testing. In:____. *Sensory Evaluation Practices*. Academic Press, London, p.243-270.

Sung, H.J., Song, W.-J., Kim, K.-P., Ryu, S., Kang, D.-H. 2014. Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 147-153.

Vaara, M., 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology Reviews*, 56, 395-411

Wiegand, L., Hilpert, K.; Hancock, R.E., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocol*, 3,163-175.

Table 1. GC-MS analysis of the essential oil from *C. citratus* D.C. Stapf. (constituents detected in concentration $\geq 1\%$).

Constituents	Percent of essential oil total mass
6-methyl-5-hepten-2-ona	1.77
dipentyl-ketone	1.06
linalool	1.03
neral	31.74
geraniol	46.16
geranyl-acetate	4.34
caryophyllene	2.02

Table 2. Duration of exposure for a ≥ 5 -log reduction of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*, in mixed population, in pineapple fruit juice containing different concentrations of the essential oil from *C. citratus* D.C. Stapf. (CCEO).

Concentration of CCEO in pineapple juice	Duration of exposure for a 5-log reduction in initial counts		
	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Enteritidis</i>
5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	15 min	15 min	15 min
2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	15 min	15 min	15 min
1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	15 min	15 min	1 h
0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1 h	45 min	12 h
Control	nd	24 h	nd

control: CCEO at 0 $\mu\text{L}/\text{mL}$; nd: no detected

Table 3. Duration of exposure for a ≥ 5 -log reduction of naturally occurring micro-organisms in fresh pineapple fruit juice containing different concentrations of the essential oil from *C. citratus* D.C. Stapf. (CCEO).

Concentration of CCEO in pineapple juice	Duration of exposure for a 5-log reduction in initial counts		
	mesophilic bacteria	lactic acid bacteria	molds and yeasts
5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	45 min	45 min	2 h
2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$	45 min	45 min	2 h
1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$	45 min	45 min	2 h
0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$	nd	nd	nd
Control	nd	nd	nd

control: CCEO at 0 $\mu\text{L}/\text{mL}$; nd: no detected

Table 4. Physico-chemical parameters of pineapple juice containing or not the essential oil from *C. citratus* D.C. Stapf. (CCEO), and stored at 7 °C.

Concentration of CCEO in pineapple juice	physico-chemical parameters/storage time					
	pH		titratable acidity*		° Brix	
	0 h	72 h	0 h	72 h	0 h	72 h
2.5 µL/mL	3.82 (±0.31)	3.91 (±0.21)	0.19 (±0.3)	0.18 (±0.2)	10.18 (±1.51)	10.87 (±0.98)
1.25 µL/mL	3.88 (±0.45)	3.93 (± 0.33)	0.18 (±0.2)	0.17 (±0.4)	10.15 (±1.82)	10.42 (±0.85)
Control	3.92 (±0.24)	3.96 (±0.36)	0.14 (±0.5)	0.13 (±0.2)	10.17 (±1.10)	10.40 (±1.33)

* units are g citric acid/g juice; control: CCEO at 0 µL/mL

APÊNDICE –B
Análise Sensorial

Nome: _____ **Idade:** _____ **Sexo:** _____

Você está recebendo três amostras de suco de abacaxi com óleo essencial para realizar a análise sensorial de acordo com os seguintes atributos discriminados na lista abaixo.

Utilizando a escala avalie: 9-Gostei muitíssimo / 8-Gostei muito /7-Gostei moderadamente /6-Gostei ligeiramente/5-Não gostei nem desgostei /4-Desgostei ligeiramente /3-Desgostei moderadamente/2-Desgostei muito/1-Desgostei muitíssimo.

Entre uma amostra e outra procure beber água e comer biscoito água e sal. Comece sempre pelo atributo odor.

Atributo			
Odor			
Aparência			
Sabor			
Textura			
Avaliação Global			
Doçura			
Sabor residual			

Amostra: _____.

Comentários: _____

Amostra: _____.

Comentários: _____

Amostra: _____.

Comentários: _____

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDAD FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)- CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE- PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Caroline Junqueira Barcellos Leite, aluna da Pós- Graduação em Ciências da Nutrição- Área de Alimentos, da Universidade Federal da Paraíba, venho convidá-lo a participar da pesquisa que pretendo realizar sobre “Efeito inibitório do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (d.c). stapf frente à bactérias patogênicas e microbiota autóctone em suco de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) merril”. Dente os objetivos dessa pesquisa está o de formular um suco de abacaxi como ingrediente na presença de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Capim-Limão, Capim-Cidreira) em diferentes quantidades. Essa bebida será então analisada sensorialmente, ou seja, você irá provar algumas amostras (10mL), que lhe será apresentada, e avaliará o odor, aparência, sabor, textura, doçura, sabor residual e avaliação global em pequenos goles da bebida. Em seguida, responderá algumas perguntas em uma ficha própria que você receberá. Este estudo seguirá os preceitos éticos da resolução 196/96 do Ministério da Saúde, que contêm diretrizes e normas para a pesquisa com seres humanos. É importante salientar que o produto é seguro, que não trará riscos a saúde e nem causará efeitos colaterais. Informo que é de livre escolha a participação neste estudo, e que, mesmo tendo concordado em participar, pode se recusar a responder perguntas ou mesmo retirar seu consentimento e desistir da participação, a qualquer momento, sem nenhum prejuízo. Comprometo-me a não revelar seu nome. As informações serão apresentadas no trabalho sem que haja a possibilidade de você ser identificado. Os resultados deste estudo servirão como subsídio para a elaboração de trabalhos científicos. Os custos da pesquisa são de total responsabilidade da pesquisadora. Ao concordar com a participação no estudo, por favor, assine abaixo.

Participante: _____

Código de identificação: _____

João Pessoa, _____ de _____ 2015.

Caroline Junqueira Barcellos Leite

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Caroline Junqueira Barcellos Leite- Pós graduanda em Ciências da Nutrição (UFPB)
Tel: (83) 86202320 E-mail: carolinejbleite@yahoo.com.br

Evandro Leite de Souza- Professor da Pós- Graduação em Ciências da Nutrição (UFPB)
Tel: (83) 21067807 E-mail: evandroleitesouza@hotmail.com

