



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E

TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

CONCENTRAÇÕES SENSORIALMENTE ACEITAS DE ÓLEO

ESSENCIAL DE *Mentha piperita* L. EM PROCESSOS

COMBINADOS PARA INIBIÇÃO DE PATÓGENOS EM

SUCOS DE FRUTAS

JOÃO PESSOA

2018

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

**CONCENTRAÇÕES SENSORIALMENTE ACEITAS DE ÓLEO
ESSENCIAL DE *Mentha piperita* L. EM PROCESSOS
COMBINADOS PARA INIBIÇÃO DE PATÓGENOS EM
SUCOS DE FRUTAS**

JOÃO PESSOA

2018

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

**CONCENTRAÇÕES SENSORIALMENTE ACEITAS DE ÓLEO
ESSENCIAL DE *Mentha piperita* L. EM PROCESSOS
COMBINADOS PARA INIBIÇÃO DE PATÓGENOS EM
SUCOS DE FRUTAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marciane Magnani

JOÃO PESSOA

2018

C331c Carvalho, Rayssa Julliane de.

Concentrações sensorialmente aceitas de óleo essencial de *Mentha piperita* L. em processos combinados para inibição de patógenos em sucos de frutas. / Rayssa Julliane de Carvalho. - João Pessoa, 2018.

131 f. : il.

Orientação: Marciane Magnani.

Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Limiares sensoriais do OEMP. 3. Óleo essencial - mentha. 4. Nanoemulsoes. 5. sucos de frutas tropicais. I. Magnani, Marciane. II. Título.

UFPB/BC

RAYSSA JULLIANE DE CARVALHO

CONCENTRAÇÕES SENSORIALMENTE ACEITAS DE ÓLEO ESSENCIAL DE
Mentha piperita L. EM PROCESSOS COMBINADOS PARA INIBIÇÃO DE
PATÓGENOS EM SUCOS DE FRUTAS

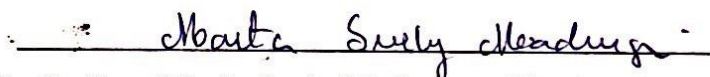
Tese Aprovada em 29 / 05 / 2018.

BANCA EXAMINADORA



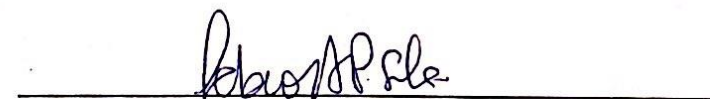
Prof. Dra. Marciane Magnani – Orientadora

Departamento de Engenharia de Alimentos/Universidade Federal da Paraíba



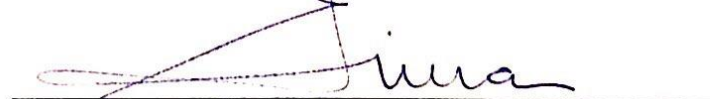
Prof. Dra. Marta Suely Madruga – Membro interno

Departamento de Nutrição/Universidade Federal da Paraíba



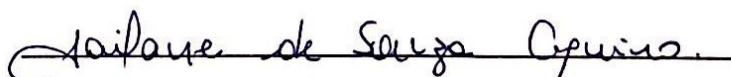
Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva – Membro interno

Departamento de Engenharia de Alimentos/Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima – Membro externo

Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino – Membro externo

Departamento de Nutrição/Universidade Federal da Paraíba

A Deus, o dono da minha vida!

Aos meus pais, Bernardina e Paulo,

*Meus mestres, exemplos de amor, simplicidade,
força e fé.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu imensurável amor, pelas bênçãos inestimáveis, por me amparar nos momentos difíceis e me suprir em todas as minhas necessidades. Agradeço por ter colocado pessoas especiais em meu caminho, que me ajudaram na realização dessa tese, e pelos momentos difíceis que me fizeram crescer e amadurecer.

Aos meus pais, Bernardina Carvalho e Paulo Carvalho, meus maiores exemplos, pela educação, pelo amor incondicional, pelas palavras de encorajamento, pelas orações, pelo sacrifício e dedicação durante toda a vida para me propiciar uma educação de qualidade e fazer com que eu realizasse muitos sonhos. Eu amo vocês muito mais do que possam imaginar.

Às minhas irmãs Thayssa Carvalho, Laryssa Carvalho e Kênia Carvalho, pela amizade, incentivo e torcida. Eu amo vocês.

À minha sobrinha, Isadora Carvalho, minha “Pitxuzinha”, o melhor presente que eu poderia receber. Obrigada por trazer alegria, luz e muito amor para minha vida. Titia te ama.

A Herbert Nunes, meu noivo, por todo amor, carinho, amizade, cuidado e incentivo. O meu eterno agradecimento por me ajudar a conquistar esse sonho.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo suporte e estrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB, seu corpo docente e as servidoras, Lindalva e Fernanda, pelo apoio e presteza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas em âmbito nacional e internacional, através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE (88881.134436/2016-01).

À professora Marciane Magnani, pela orientação durante a realização do Doutorado, pelos ensinamentos, por toda sua dedicação, por acreditar em meu potencial, por ter me confiado trabalhos que eu jamais pensei conseguir realizar e pelo suporte e disponibilização de recursos e infraestrutura de laboratório. Obrigada.

Ao professor Rafael Pagán, pelos ensinamentos durante a realização do PDSE, pelas conversas produtivas, pelos conselhos e por todo cuidado comigo durante minha estância na Universidade de Zaragoza/Espanha.

Ao professor Diego Garcia-Gonzalo, por toda a ajuda e ensinamentos ao longo da estância na Universidade de Zaragoza.

Aos professores, Marta Madruga, Fábio Silva, Jailane Aquino e Edeltrudes Lima, membros da banca examinadora, pela valiosa contribuição.

Às professoras-amigas Elieidy e Mônica, pelas contribuições na qualificação, pela amizade e carinho com que sempre me atenderam.

A Tarcísio Lima Filho, pela contribuição metodológica.

Ao Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da Universidade Federal da Paraíba, em especial ao técnico Sócrates Golzio, pela disponibilidade em ajudar e presteza.

À Agência de Inovação Tecnológica (INOVA/UFPB), em especial aos servidores Iungue Brandão e Cleverton Fernandes, pela ajuda e presteza.

Aos meus amigos-irmãos, Allan, Larissa, Mariana, Eli, Hamlet, Allinne e Júnior, pela valiosa amizade, torcida e, principalmente, por terem me presenteado com aqueles que hoje formam o “bonde da Tia Pitú”, Isadora, Letícia, Théo e Noah.

À Larissa Ramalho e Maísa Chaves, as PIBICs mais lindas e dedicadas que alguém poderia ter, pela ajuda e amizade.

À Geany Targino, irmã-amiga fiel, pessoa de luz e amor, meu muito obrigada pela amizade insubstituível, pelo amor, carinho, cuidado e pelos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório. Sem você a caminhada até aqui teria sido mais árdua.

À Narciza Arcanjo e Taliana Alencar, amigas que estão ao meu lado desde a graduação, por se fazerem presente em momentos tristes e alegres, pela amizade, por serem grandes incentivadoras dos meus sonhos.

Às amigas Carine Maciel, Renata Maynart e Keliane Lunguinho, pelo apoio.

Às amigas Jossana Sousa, Estefânia Garcia e Ingrid Guerra, por compartilharem seus conhecimentos, pelos conselhos e amizade. Não tenho palavras para agradecer-las.

Aos colegas que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (DEA/CT/UFPB), Adma, Aline, Camila, Danieli, Helena, Janaína, Laênia, Myrella, Rhayane, Rodrigo, Whyara e Winnie, pelo carinho, cooperação, e pelos bons momentos de convívio.

Aos colegas do Laboratório de Novas Tecnologias de Processamento de Alimentos do Departamento de Produção Animal (UNIZAR/Espanha), Diana, Elisa, Daniel, Maria, Adriana, Carmen, Sílvia, JuanMa, Marcos, Ângulo, Carlota e Virgínia, pela recepção, ajuda, cuidado e pela alegria diária. Muchas gracias, chicos.

Aos amigos, Laine, Fernando, Raquel, Pedro, Roberto, Rodrigo, Viviane, Glênio, Thanise, Daniel e Iuri, pelos momentos divertidos vividos, pelo cuidado, ajuda e, principalmente, por serem minha família em Zaragoza.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e torceram pelo meu sucesso, muito obrigada!

"Olho nenhum viu, ouvido nenhum ouviu, mente nenhuma imaginou o que Deus preparou para aqueles que o amam."

1 Coríntios 2:9

RESUMO

O óleo essencial de *Mentha piperita* L. (OEMP) tem sido sugerido como uma alternativa promissora para a conservação de sucos de frutas, entretanto concentrações de OEMP efetivas contra patógenos podem alcançar o limiar de rejeição sensorial dos consumidores e tornar sua aplicação inviável nestes produtos. O uso combinado de OEs com tratamento térmico moderado (TTM) ou tecnologias emergentes, como campo elétrico pulsado (CEP) e a alta pressão hidrostática (APH), tem sido reportado como uma opção estratégica para a incorporação de OEs em sucos. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a aplicação combinada de concentrações sensorialmente aceitas de OEMP com TTM, CEP ou APH na inibição de patógenos em sucos de frutas tropicais. Na primeira etapa do presente estudo, foram determinados os limiares sensoriais de aceitação comprometida (LAC) e de rejeição (LR) do OEMP em sucos de cajá (*Spondias mombim* L.), goiaba (*Psidium guajava* L.) e manga (*Mangifera indica* L.). A eficácia de concentrações de OEMP abaixo do LR frente *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Enteritidis PT4 nesses sucos foi avaliada na aplicação isolada do OEMP e em combinação com TTM (54 °C; 8, 10 ou 12 min). Os efeitos da aplicação combinada do OEMP e TTM sobre os parâmetros físico-químicos de qualidade dos sucos estudados foram também avaliados. Na segunda etapa, as concentrações de OEMP abaixo do LR foram avaliadas em nanoemulsões (n-MPEO) aplicadas isoladas ou combinadas com TTM (50, 52 ou 54 °C), CEP (20, 25 ou 30 kV/cm) e APH (150, 200 ou 300 MPa) frente *E. coli* O157:H7 em sucos de goiaba e manga. A concentração inibitória mínima de OEMP frente *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis* PT4 foi de 5,0 µL/mL. O LAC de OEMP foi de 0,30 µL/mL em suco de cajá, 0,31 µL/mL em suco de goiaba e 0,32 µL/mL em suco de manga. O LR de OEMP foi de 1,36 µL/mL em suco de cajá e 1,34 µL/mL em suco de goiaba e manga. Somente concentrações de OEMP próximas ou superiores ($\geq 1,25$ µL/mL) ao LR causaram reduções $\geq 5 \log_{10}$ UFC/mL nas contagens de *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis* PT4 nos sucos de cajá, goiaba e manga. O uso combinado de concentrações de OEMP abaixo do LR (0,16, 0,31 ou 0,63 µL/mL) e TTM (54 °C) causou uma redução $\geq 5 \log_{10}$ UFC/mL nas contagens de *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis* PT4 nestes mesmos sucos. O tempo para alcançar a redução de $5 \log_{10}$ UFC/mL da população inicial de patógenos nos sucos diminuiu quando a concentração de OEMP usada em combinação com o TTM aumentou. O OEMP combinado com TTM não alterou os parâmetros físico-químicos monitorados nos sucos de cajá, goiaba e manga. A n-OEMP (5,0 µL/mL) preparada pelo método de inversão de fase de emulsão (EPI), apresentou tamanho < 200 nm, índice de polidispersidade $\leq 0,32$, estabilidade e eficácia antimicrobiana frente *E. coli* O157:H7 durante 4 meses de armazenamento. Em comparação ao OEMP em suspensão (s-MPEO) na mesma concentração, a n-OEMP mostrou maior eficácia antimicrobiana a longo prazo no suco de manga. Em combinação com TTM, CEP e APH, as concentrações de n-OEMP (0,16, 0,31 e 0,63 µL/mL) mostraram uma eficácia similar ou maior do que s-OEMP frente *E. coli* O157:H7. A eficácia do tratamento combinado variou com a concentração de n-OEMP, intensidade de campo elétrico, ou temperatura aplicada. Os resultados indicam o uso de concentrações de OEMP (em suspensão ou nanoemulsão) abaixo do LR em combinação com TTM, CEP e APH como tecnologias viáveis para conservação de sucos de frutas tropicais.

Palavras-chave: limiares sensoriais; *Mentha*; nanoemulsoes; processo combinado; sucos de frutas tropicais; tecnologias emergentes.

ABSTRACT

Mentha piperita L. essential oil (MPEO) has been proposed as a promising alternative to preserve fruits juices, however effective concentrations of MPEO may reach the consumer's sensory rejection threshold. The combined application of EOs and mild heat (MH) or emerging technologies, such as pulsed electric field (PEF) and high hydrostatic pressure (HHP), has been reported as a strategic option for the incorporation of EOs into juices. Therefore, the aim of this study was to evaluate the combined application of sensorially accepted concentrations of MPEO with MH, PEF or HHP in the inhibition of pathogens in tropical fruit juices. In the first step of the study, the compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT) of MPEO were determined in cajá (*Spondias mombim* L.), guava (*Psidium guajava* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) juices. The efficacy of MPEO concentrations below the RT against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Enteritidis PT4 in these juices were evaluated alone and combined with MH (54 °C; 8, 10 or 12 min). The effects of the combined application of MPEO and MH on the physical-chemical parameters of the studied juices were also evaluated. In the second step, the MPEO concentrations below RT were evaluated in nanoemulsions (n-MPEO) applied alone or combined with MH (50, 52 or 54 °C), PEF (20, 25 or 30 kV/cm) and HHP (150, 200 or 300 MPa) against *E. coli* O157: H7 in guava and mango juices. The minimal inhibitory concentration of OEMP against *E. coli* O157: H7 and *S. Enteritidis* PT4 was 5.0 µL/mL. The CAT of MPEO was 0.30 µL/mL in cajá juice, 0.31 µL/mL in guava juice and 0.32 µL/mL in mango juice. The RT of MPEO was 1.36 µL/mL in cajá juice and 1.34 µL/mL in guava and mango juices. Only MPEO concentrations close or higher (≥ 1.25 µL/mL) than RT caused reductions of $\geq 5 \log_{10}$ CFU/mL in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in in cajá, guava and mango juices. The combined use of MPEO concentrations below the RT (0.16, 0.31 or 0.63 µL/mL) and MH (54 °C) caused a reduction $\geq 5 \log_{10}$ CFU/mL in counts of *E. coli* O157: H7 and *S. Enteritidis* PT4 in same juices. The time to achieve the 5 \log_{10} CFU/mL reduction of the initial population of pathogens decreased when the MPEO concentration used in combination with the MH increased. The MPEO combined with MH did not change the monitored physicochemical parameters in cajá, guava and mango juices. The n-MPEO (5.0 µL/mL) prepared by the emulsion phase inversion (EPI) method presented size < 200 nm, polydispersity index ≤ 0.32 , antimicrobial stability and efficacy against *E. coli* O157: H7 during 4 months storage. Compared to MPEO suspension (s-MPEO) at the same concentration, n-OEMP showed a greater long term antimicrobial efficacy in mango juice. In combination with MH, PEF and HHP, n- MPEO concentrations (0.16, 0.31 and 0.63 µL / mL) showed similar or greater efficacy than s- MPEO against *E. coli* O157: H7. The efficacy of combined treatment varied with the n-MPEO concentration, electric field intensity or applied temperature. The results indicate the use of MPEO concentrations (in suspension or nanoemulsion) below RT in combination with MH, PEF and HHP as feasible technologies for preservation of tropical fruit juices.

Keywords: sensory thresholds; *Mentha*; nanoemulsions; combined process; tropical fruit juices; emerging technologies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das atividades realizadas nas etapas do estudo conduzidas no Brasil e Espanha..... 38

Figura 2 - Ordem de apresentação das amostras em cada sessão de avaliação sensorial 42

ARTIGO 1

Figure 1 - Calculated t values and mean hedonic scores in function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration for cajá (A), guava (B) and mango (C) juices. The black dashed line represents the tabulated t ($t_{tab} = 2.009$) and the black circle (○) the compromised acceptance threshold. The gray dashed line represents a mean hedonic score of 5 and the gray circle (○) the rejection threshold..... 89

Figure 2 - Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Enteritidis PT4 (B) in cajá juice at 4 °C as a function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration: (*) control: 0 µL/mL; (○): 0.16 µL/mL; (●): 0.31 µL/mL; (□) 0.63 µL/mL; (■) 1.25 µL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. The dotted line represents the detection limit (2 log₁₀ CFU/mL) 91

Figure 3 - Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Enteritidis PT4 (B) in guava juice at 4 °C as a function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration: (*) control: 0 µL/mL; (○): 0.16 µL/mL; (●): 0.31 µL/mL; (□) 0.63 µL/mL; (■) 1.25 µL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. The dotted line represents the detection limit (2 log₁₀ CFU/mL) 92

Figure 4 - Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Enteritidis PT4 (B) in mango juice at 4 °C as a function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration: (*) control: 0 µL/mL; (○): 0.16 µL/mL; (●): 0.31 µL/mL; (□) 0.63 µL/mL; (■) 1.25 µL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. The dotted line represents the detection limit (2 log₁₀ CFU/mL) 93

Figure 5 - Log₁₀ cycles of inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT4 (A, C, E) and *Escherichia coli* O157:H7 (B, D, F) after a heat treatment of 8 (dotted bars), 10 (white bars) and 12 (black bars) min at 54 °C alone or in combination with different concentrations (µL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in cajá, guava, and mango juices. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. Detection limit of the test: 2.0 log₁₀ CFU/mL..... 94

ARTIGO 2

Figure 1 - Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 after exposure to n-MPEO at 5 µL/mL for 80 min in mango juice at 35 °C. Bars correspond to freshly prepared nanoemulsions (black bars), and after 1st week (dark grey bars), 2nd week (light grey bars), 3th week (dotted bars), and 4th month (white bars) of storage at 4 °C. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments. The dotted line represents the detection limit..... 115

Figure 2 - Survival curves of *E. coli* O157:H7 after exposure to s-MPEO (○) or n-MPEO (●) at 5 µL/mL for 100 min in guava (A) and mango (B) juices at 35 °C. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments. The dotted line represents the detection limit..... 116

Figure 3 - Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157: H7 after a heat treatment for 10 min at 50 °C (A; D), 52 °C (B; E) and 54 °C (C; F) applied as a single agent (0.0; grey bars) or in combination with different concentrations (0.13, 0.31 and 0.63 µL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in the form of a nanoemulsion (white bars) or a suspension (black bars) in guava (A; B; C) and mango (D; E; F) juices. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments 117

Figure 4 - Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157: H7 after a pulsed electric field treatment for 150 µs at 20 kV/cm (A; D), 25 kV/cm (B; E) and 30 kV/cm (C; F) applied as a single agent (0.0; grey bars) or in combination with different concentrations (0.13, 0.31 and 0.63 µL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in the form of a nanoemulsion (white bars) or a suspension (black bars) in guava (A; B; C) and mango (D; E; F) juices. The error bars in the

figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments..... 118

Figure 5 - Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157: H7 after a high hydrostatic pressure treatment for 15 min at 150 MPa (A; D), 200 MPa (B; E) and 300 MPa (C; F) applied as a single agent (0.0; grey bars) or in combination with different concentrations (0.13, 0.31 and 0.63 µL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in the form of a nanoemulsion (white bars) or a suspension (black bars) in guava (A; B; C) and mango (D; E; F) juices. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments..... 119

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Constituents identified in the essential oil from *Mentha piperita* L. Results are expressed as a percentage (%) of the total area 86

Table 2 - Adjusted models of CAT and RT determination of *Mentha piperita* L. essential oil in cajá, guava and mango juices, and their respective coefficients of determination 87

Table 3 - Physicochemical parameters (average \pm standard deviation; n = 6) of cajá, guava and mango juices before and after the treatment with *Mentha piperita* L. essential oil (MPEO) in combination with mild heat treatment (54 °C; 12 min) and after 24 h of refrigerated storage (4 \pm 0.5 °C) 88

ARTIGO 2

Table 1 - Droplet size and polydispersity index (PDI) of nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil stored under refrigeration. Data represent the mean \pm standard deviation of the mean of at least three independent experiments. by EPI method 115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos que avaliam o efeito combinado de óleos essenciais e/ou seus constituintes individuais com outras tecnologias de conservação de sucos de frutas 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| USFDA | Food and drug administration |
| OEs | Óleos essenciais |
| GRAS | Geralmente Reconhecido como Seguro |
| OEMP | Óleo essencial <i>Mentha piperita</i> L. |
| TTM | Tratamento térmico moderado |
| CEP | Campo elétrico pulsado |
| APH | Alta pressão hidrostática |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| LAC | Limiar de aceitação comprometida |
| LR | Limiar de rejeição |
| DVAs | Doenças veiculadas por alimentos |
| CBHI | Caldo infusão de cérebro e coração |
| ABHI | Agar infusão de cérebro e coração |
| DO | Densidade óptica |
| NHAC | Nota hedônica da amostra controle |
| NHAE | Nota hedônica da amostra estímulo |
| s-OEMP | Suspensões de óleo essencial <i>Mentha piperita</i> L. |
| n-OEMP | Nanoemulsões de óleo essencial <i>Mentha piperita</i> L. |
| ATSEL | Agar tryptic soy adicionado de extrato de levedura |
| CTSEL | Caldo tryptic soy adicionado de extrato de levedura |
| PDI | Índice de polidispersão |
| EPI | Emulsion phase inversion |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 SUCOS DE FRUTA | 22 |
| 2.2 CONSERVAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS. | 25 |
| 2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES DE SUCOS DE FRUTAS | 28 |
| 2.4 APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM COMBINAÇÃO COM OUTRAS TECNOLOGIAS DE CONSERVAÇÃO EM SUCOS DE FRUTAS..... | 31 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3.1 PRIMEIRA ETAPA..... | 38 |
| 3.1.1 Óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> L. (OEMP) | 38 |
| 3.1.2 Micro-organismos e condições de crescimento | 39 |
| 3.1.3 Sucos de frutas | 39 |
| 3.1.4 Identificação dos constituintes do OEMP | 40 |
| 3.1.5 Determinação da concentração inibitória mínima do OEMP | 41 |
| 3.1.6 Determinação dos limiares sensoriais do OEMP em sucos de frutas: limiar de aceitação comprometida (LAC) e limiar de rejeição (LR) | 42 |
| 3.1.7 Avaliação da inativação de <i>E. coli</i> O157: H7 e <i>S. Enteritidis</i> PT4 em sucos de frutas por OEMP..... | 43 |
| 3.1.8 Avaliação da inativação de <i>E. coli</i> O157:H7 e <i>S. Enteritidis</i> PT4 em sucos de frutas por uso combinado de OEMP e tratamento térmico moderado (TTM)..... | 43 |
| 3.1.9 Determinação de parâmetros físico-químicos dos sucos de frutas após tratamentos combinados (OEMP e TTM) | 44 |
| 3.1.10 Análise estatística..... | 44 |
| 3.2 SEGUNDA ETAPA..... | 45 |
| 3.2.1 Micro-organismo e condições de crescimento..... | 45 |
| 3.2.2 Sucos de frutas | 46 |
| 3.2.3 OEMP: procedimento de adição direta e preparo de nanoemulsões | 46 |
| 3.2.4 Caracterização, estabilidade e reprodutibilidade da n-OEMP | 47 |
| 3.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana s-OEMP e n-OEMP | 47 |
| 3.2.6 Aplicação combinada de TTM, CEP ou APH com OEMP | 48 |
| 3.2.6.1 TTM e OEMP | 48 |
| 3.2.6.2 CEP e OEMP | 48 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.6.3 APH e OEMP..... | 49 |
| 3.2.7 Contagens de células viáveis | 49 |
| 3.2.8 Análise estatística..... | 49 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 4.1 ARTIGO 1 | 66 |
| 4.2 ARTIGO 2 | 95 |
| 4.3 PATENTE | 120 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 122 |
| APÊNDICES | 123 |
| APÊNDICE A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa | 123 |
| APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 128 |
| APÊNDICE C - Formulário para Análise Sensorial..... | 130 |
| ANEXOS | 131 |
| ANEXO A - Relatório técnico do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> L..... | 131 |

1 INTRODUÇÃO

A produção de frutas no Brasil cresceu significativamente nos últimos anos e, atualmente, o país ocupa uma posição de destaque no mercado nacional e internacional, projetando a fruticultura brasileira. Os efeitos benéficos da ingestão de frutas e produtos derivados são atribuídos à alguns compostos bioativos como tocoferóis, carotenóides, fenólicos (KONGKACHUICHAJ et al., 2015; SANTOS et al., 2015), vitaminas, minerais e fibras (LIU, 2013). Sucos, smoothies e bebidas de frutas fermentadas e enriquecidas são uma forma popular de consumir frutas frescas e contribuir para uma dieta saudável e um estilo de vida saudável (HURTADO et al., 2015; PETRUZZI et al., 2017; RAMACHANDRAN; NAGARAJAN 2014).

A disponibilidade e consumo de sucos de frutas tropicais é crescente em todo mundo. Devido ao sabor atraente e aspecto refrescante, estes produtos são bem aceitos por todas as faixas etárias (NEVES et al., 2011; PETRUZZI et al., 2017; KUSKOSKI et al., 2006). No entanto, sucos de frutas são altamente suscetíveis à contaminação microbiana durante o processamento e armazenamento (CARMO; DANTAS; RIBEIRO, 2014; ESPINA et al., 2013b), representando um risco potencial para os consumidores (MATTIOLI et al., 2013; SIMFORIAN et al., 2015).

Apesar da acidez inerente dos sucos de frutas, que é considerado um fator intrínseco importante para o controle de bactérias contaminantes, os surtos associados a sucos não pasteurizados desafiaram a convicção de que os sucos de frutas ácidas não veiculam patógenos (CALLEJÓN et al., 2015; RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2009). Portanto, a elevada acidez de sucos como cajá, goiaba e manga, que apresentam valores baixos de pH, em média 3,0, 4,0 e 4,7, respectivamente, não deve ser considerada suficiente para preservação desses produtos.

Escherichia coli O157:H7 e *Salmonella enterica* tem sido citados como os agentes patogênicos frequentemente envolvidos em surtos de sucos de frutas em todo o mundo (CDC, 2016; EFSA 2015; VOJDANI et al., 2008). Portanto, recomenda-se que as tecnologias aplicadas utilizadas durante o processamento de sucos promovam uma redução de cinco ciclos logarítmicos ($5 \log_{10}$ UFC/mL; 99,999%) na população de patógenos relevantes em saúde pública (USFDA, 2001). Entretanto, os órgãos legisladores não especificam o método que deve ser aplicado.

Tradicionalmente, a estabilidade dos sucos durante a vida de prateleira é alcançada pelo processamento térmico, sendo a pasteurização (temperatura de 72 a 82 °C) o método

mais utilizado (PETRUZZI et al., 2017), ou através do uso de conservantes sintéticos, como benzoato de sódio, sorbato de potássio e dióxido de enxofre (AMIRPOUR et al., 2015). No entanto, a pasteurização tende a reduzir a qualidade e o frescor do produto, e os conservantes químicos têm sido rejeitados pelos consumidores devido aos seus possíveis efeitos tóxicos, o que vem aumentando o interesse de explorar novas e efetivas estratégias de conservação de sucos de frutas.

O uso de óleos essenciais de plantas (OEs) tem sido sugerido como uma alternativa promissora para a preservação do suco de frutas (SEOW et al., 2014). O OEs obtidos de espécies de *Mentha* são amplamente utilizados como agentes aromatizantes de alimentos (TYAGI; MALIK, 2011). Geralmente reconhecido como seguro (GRAS) para uso em alimentos e bebidas pela Food and Drug Administration, o OE de *Mentha piperita* L. (OEMP) é ativo contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos relacionados a alimentos, incluindo *E. coli* O157:H7 e *Salmonella enterica* (DJENANE et al., 2012; TYAGI et al., 2013; SOUSA GUEDES et al., 2016).

A principal barreira para o uso de OEs em sucos de frutas está relacionada ao forte sabor dessas substâncias (MACWAN et al., 2016, SOUZA, ALMEIDA E SOUSA GUEDES, 2016). Para atingir os efeitos antimicrobianos desejados, a concentração de OE necessária pode atingir o limiar de rejeição sensorial dos consumidores (HYLDGAARD, MYGIND E MEYER, 2012). Entretanto, os estudos que avaliam a eficácia de OEs como tecnologias de conservação de sucos não reportam quais seriam os limiares sensoriais para estas substâncias. Além disso, apesar da eficácia antimicrobiana comprovada dos OEs, sua elevada reatividade e hidrofobicidade tem sido sugerida como um desafio para a incorporação direta em alimentos e bebidas (DONSÌ; FERRARI, 2016; KUJUR et al., 2017). Nanoemulsões de OEs têm sido estudadas como estratégias para minimizar a separação de fases, melhorando a dispersão de OE em produtos alimentares e conseqüentemente as propriedades antimicrobianas (DONSÌ; FERRARI, 2016; PAGÁN et al., 2018).

O uso combinado de OEs com tratamento térmico moderado (TTM) ou tecnologias emergentes, como campo elétrico pulsado (CEP) e a alta pressão hidrostática (APH), tem sido reportado como uma opção estratégica para a incorporação de OEs em sucos (AIT-OUAZZOU et al., 2013; CHERRAT et al., 2014; ESPINA et al., 2013b). O TTM pode aumentar a eficácia antimicrobiana dos OEs porque influencia na formação da fase de vapor dos seus voláteis e, conseqüentemente, melhora a solubilização através da membrana celular (BURT, 2004). Por sua vez, os tratamentos de CEP e APH induzem mudanças estruturais nas

membranas celulares através da formação de poros que favorecem a difusão dos OEs na célula, resultando em danos às funções vitais das células (BAPTISTA et al., 2016; MOSQUEDA-MELGAR; RAYBAUDI-MASSILIA; MARTÍN-BELLOSO, 2008a).

Considerando os aspectos citados, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar a eficácia da aplicação isolada e combinada de concentrações sensorialmente aceitas de OEMP (em suspensão e nanoemulsão) com TTM, CEP e APH, na inibição do crescimento/sobrevivência de bactérias patogênicas de importância em sucos de frutas tropicais, cultivadas na região Nordeste do Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SUCOS DE FRUTA

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, depois da China e Índia, representando um setor importante da agricultura brasileira (MAPA, 2018). Na região Nordeste do Brasil, a fruticultura possui elevada importância econômica e social, respondendo por 27% da produção nacional de frutas, destacando-se em diversos cultivos como coco, goiaba, mamão, manga, maracujá, abacaxi e melão. Uma das explicações para o bom desempenho da fruticultura no Nordeste são as condições de luminosidade, temperatura e umidade relativa do ar que conferem à região uma vantagem em relação ao Sul e Sudeste do País para o cultivo de grande quantidade de culturas (VIDAL; XIMENES, 2016).

De acordo com dados da Associação Brasileira dos Produtores Exportadores de Frutas e Derivados, o Brasil exportou 26 tipos de frutas frescas ou secas, além de conservas e preparado em 2016, totalizando 789,889 mil toneladas e US\$ 702,388 milhões. A manga liderou a lista das frutas exportadas, totalizando 154,211 mil toneladas e US\$ 179,932 milhões (KIST et al., 2017). Em 2017, as exportações brasileiras somaram 784 mil toneladas de frutas (2,5% de toda a produção nacional) e colocaram o Brasil na 23ª posição no *ranking* mundial de exportadores de frutas. O valor faturado com as vendas de frutas no ano foi de US\$ 852 milhões (MAPA, 2018).

O aumento do consumo mundial de frutas (*in natura* e processadas) pode ser apontado como uma tendência recente que afeta diretamente a indústria de processamento de frutas. A busca por alimentos saudáveis e nutritivos aliada a manutenção de um estilo de vida moderno, que exige a redução no tempo de preparo e de consumo dos alimentos, podem ser considerados como importantes indutores do consumo de frutas processadas. O consumo de frutas processadas e seus derivados também é estimulado pelo aumento da diferenciação e da disponibilidade de produtos em termos de suas características nutritivas e sabores (AMARIZ, 2015).

Os produtos derivados de frutas são aqueles elaborados a partir de frutas inteiras e/ou em partes e/ou sementes, obtidos, processados, embalados, armazenados, transportados e conservados por processos tecnológicos considerados seguros para a produção de alimentos e em condições que não produzam, desenvolvam e/ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde dos consumidores (BRASIL, 2005). Dentre os produtos derivados de frutas os sucos têm merecido destaque devido a crescente procura dos

consumidores por produtos convenientes, refrescantes, com baixo teor de calorias e conteúdo de antioxidantes, vitaminas e minerais que desempenha papel importante na prevenção de doenças cardíacas, câncer e diabetes (ESPINA et al., 2014).

Os sucos de frutas são bebidas não fermentadas obtidas de frutas maduras por processamento tecnológico adequado que devem ser submetidas a tratamentos de conservação que assegurem sua qualidade nutricional e microbiológica até o momento do consumo (BRASIL, 2009). A demanda atual é crescente para sucos de frutas tropicais, que vêm ocupando papel de relevância no agronegócio brasileiro (CARVALHO; MATTIETTO; BECKMAN, 2017; KUSKOSKI et al., 2006).

O consumo de suco e néctar a base de frutas na União Européia foi de 9,6 bilhões de litros em 2015 (ASSOCIAÇÃO EUROPEIA DE SUCOS DE FRUTAS, 2016). No Brasil, desde 2005, tem ocorrido um contínuo crescimento da produção e do consumo de bebidas prontas para o consumo. No ano de 2010, 550 milhões de litros de sucos foram consumidos (IBRAF, 2011) e, até 2016, esse número cresceu na casa dos dois dígitos (TREICHEL et al., 2016). Estima-se que o crescimento no consumo de sucos no Brasil entre os anos de 2016 e 2020 seja em média de 3% (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2017b). Em relação a comercialização, entre os anos de 2011 e 2016 houve um aumento nas vendas de sucos de, aproximadamente, 1,5 para 2,3 milhões de litros (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2017a). Atendendo a tendência crescente de consumo de sucos, cajá, goiaba e manga destacam-se como frutas que apresentam grande potencial para uso na preparação destes produtos, a fim de atender aos requisitos desejados pelo consumidor.

O cajá (*Spondias mombim* L.) é um fruto bastante popular no Brasil, consumido na forma *in natura* principalmente no Nordeste, e mais comumente na forma de polpa em outras regiões do país (FRANÇA; SILVA; PORTO, 2017). É um fruto caracterizado como drupa de 3 a 6 cm de comprimento, de formato ovoide, achatado na base, com cor variando do amarelo ao alaranjado, casca fina e lisa. Sua polpa, pouco espessa e suculenta, de sabor ácido-adocicado, também varia do amarelo ao alaranjado. O fruto é extremamente aromático, sendo essa característica responsável, em parte, pela sua boa aceitabilidade (BRASIL, 2015; SILVIANO; SILVA; SANTOS, 2017). O cajá tem propriedade funcionais, pois possui elevado teor de carotenoides, vitamina C e taninos, que podem atuar como substâncias antioxidantes. Estes aspectos colaboram para o aumento do consumo e interesse das indústrias alimentícias que o utilizam como matéria-prima (MATTIETTO; LOPES; MENEZES, 2010).

A goiaba (*Psidium guajava* L.) é uma fruta nativa da América tropical, encontrada em todas as regiões do Brasil, largamente consumida in natura e industrialmente é empregada na formulação sucos, polpas, geleias e doces (FORATO et al., 2015). Possui forma arredondada ou ovoide, medindo de 5 cm a 10 cm. Externamente, quando madura, é amarela-esverdeada e muito aromática. Internamente, a polpa é abundante, podendo ser róseo-avermelhada ou branca, dependendo da variedade, com sementes pequenas e numerosas (BRASIL, 2015). Com importante qualidade nutricional, a goiaba é rica em ácido ascórbico, cálcio, fibra, licopeno e vitaminas E, A, B6 e B2 (COSTA et al., 2017).

A manga (*Mangifera indica* L.), por sua vez, é cultivada em muitas partes do mundo, particularmente em países tropicais, ocupando a 2ª posição como fruta tropical (JAHURUL et al., 2015). É uma fruta do tipo drupa, de formato ovóide, alongado, de acordo com a variedade. Sua casca é fina, porém resistente, e pode apresentar cores diversas entre o verde, vermelho, rosa, amarelo ou laranja, com ou sem manchas pretas. A polpa é originalmente fibrosa, suculenta, de coloração amarela ou alaranjada. No Brasil, a manga é bastante consumida *in natura*, mas também é processada pela indústria de sucos, compotas, geleias, sorvetes e chutney (BRASIL, 2015). Tem sido bem documentado que a manga é uma importante fonte de micronutrientes, vitaminas e outros fitoquímicos. Além de fornecer energia, fibras dietéticas, carboidratos, proteínas, gorduras e compostos fenólicos (JAHURUL et al., 2015; THARANATHAN; YASHODA; PRABHA, 2006).

A qualidade dos sucos de frutas pode ser influenciada por diferentes fatores, enzimáticos, químicos, físicos e microbiológicos. A influência destes promove alterações no produto comprometendo as características sensoriais e nutricionais. Estas modificações são suscetíveis de ocorrerem nas diferentes etapas da fabricação até o consumo final do suco. As condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processo de fabricação do suco são os principais indícios que comprometem a segurança microbiológica do produto (SILVEIRA; BERTAGNOLLI, 2012; SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016).

A elevada acidez dos sucos de frutas, foi considerada durante muito tempo suficiente para evitar a proliferação de micro-organismos. Porém, o conceito de deterioração de produtos ácidos precisou ser revisto diante de relatos de deterioração de suco de maçã pasteurizado por bactérias tolerantes a acidez e temperatura (CERNY; HENNICH; PORALLA, 1984).

A deterioração microbiana de frutas e produtos derivados ocorre principalmente devido à contaminação por fungos filamentosos, leveduras, bactérias lácticas e acéticas, assim

como bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. e *Alicyclobacillus* spp. Estudos sugerem que, devido ao desenvolvimento de resistência ao meio ácido e ao calor, além dos micro-organismos deteriorantes, bactérias patogênicas tais como *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria* spp. podem contaminar sucos de frutas e permanecer viáveis por um período igual ou superior a 30 dias (RAYBAUDI-MASSILIA et al., 2009; ANEJA et al., 2014a).

Cepas de *S. enterica* e *Escherichia coli* O157:H7 já demonstraram ser ácido-tolerantes em sucos, estando associadas a diversos surtos relatados nos últimos anos (CDC, 2016; EFSA 2015; VOJDANI et al., 2008). Acredita-se, que essa resistência ao pH ácido é devido à sua capacidade de produzir algumas proteínas do estresse, após exposição ao ambiente ácido (CEBRIÁN et al., 2009). *E. coli* O157: H7 é um sorotipo produtor de toxina Shiga responsável por uma variedade de doenças intestinais e extra intestinais, como diarreia, infecções do trato urinário, septicemia e meningite neonatal, enquanto é considerada a principal causa de colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombocitopênica (KAHRAMAN et al., 2017; POIMENIDOU et al., 2016). Já, *S. enterica* tem se destacado como uma das principais causas de infecções transmitidas por alimentos. Dentre os sorovares epidêmicos deste patógeno, *S. Enteritidis* é um dos prevalentes em surtos notificados em diversos países (FARDSANEI et al., 2017; CDC, 2016).

Devido a possibilidade de sobrevivência de bactérias patogênicas em sucos de frutas, a Agência americana Food and Drug Administration (USFDA) emitiu como regra final da Análise de Perigos e Ponto de Crítico de Controle do processamento de sucos de frutas e vegetais a exigência de que os sucos sejam processados para obter redução de 5 log₁₀ UFC/mL (99,999%) da população de micro-organismos patogênicos (USFDA 2001). Entretanto, até o presente, os órgãos legisladores não especificam os métodos que devem ser empregados para obter tal redução.

2.2 CONSERVAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS

Durante a produção de alimentos, torna-se fundamental que medidas sejam tomadas para assegurar a inocuidade e estabilidade do produto final, que deve ter elevada qualidade nutricional atrelada a uma longa vida de prateleira. A qualidade dos alimentos pode ser afetada por alterações de ordem física, química ou microbiológica (FORSYTHE, 2010). Deve-se considerar a contaminação microbiana tanto sob os aspectos de deterioração e consequentes perdas econômicas, quanto no que se refere aos aspectos de segurança dos

consumidores, quando considerada a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos (DVAs), as quais representam um problema de saúde pública (FERREIRA, 2017). Os métodos empregados na conservação de alimentos são diversos. Existem aqueles que inibem parcial ou completamente o crescimento microbiano (ex. refrigeração, congelamento, desidratação, salga, controle da atividade de água e uso de conservante), os que inativam os microorganismos (ex. esterilização e pasteurização) e os que restringem seu acesso aos alimentos (ex. embalagem e processamento asséptico) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O calor é o método de preservação mais utilizado no processamento de alimentos e os alimentos tratados com calor geralmente possuem um bom nível de segurança microbiológica. Quando aplicado corretamente, o calor pode eliminar agentes biológicos que deterioram ou comprometem a segurança alimentar. Os fatores de tratamento aplicados (binômio tempo/temperatura) podem variar para atingir os níveis de inativação microbiana desejada, que vão desde reduções limitadas de carga microbiana até a esterilização completa (JUNEJA; NOVAK, 2003; YOUSEF; COURTNEY, 2003).

O calor causa danos aos componentes das células macromoleculares; portanto, a principal função das proteínas de estresse induzidas pelo calor é reparar, ou destruir esses componentes danificados para que eles não perturbem o metabolismo celular. Proteínas de estresse induzidas pelo calor auxiliam na organização de proteínas de membrana danificadas pelo calor (YOUSEF; COURTNEY, 2003). Além dessas mudanças, algumas bactérias também alteram sua membrana celular em resposta ao calor, aumentando a proporção de ácidos graxos *trans* para *cis* na membrana. Esta mudança estrutural ocorre para diminuir a fluidez da membrana causada pelo aumento das temperaturas (CRONAN, 2002). Nguyen, Corry e Miles (2006) mostraram que a morte celular em *Campylobacter jejuni* e *C. coli* coincidiu com o desdobramento das regiões mais termicamente lábeis do ribossomo. Além disso, as subunidades alfa e beta da RNA polimerase, também podem se desenrolar ao mesmo tempo e contribuir para a morte celular. Quando a exposição ao calor não é suficientemente prolongada, a bactéria restabelece as condições em que a sua proteína é estável, voltando a ter as mesmas características de antes da exposição ao calor, denominada de desnaturação reversível. Quando a exposição ao calor é prolongada, não há restauração das condições nas quais a proteína é estável, portanto a desnaturação é irreversível. As reações envolvendo desnaturação proteica são extremamente complexas e pouco compreendidas (JUNEJA; NOVAK, 2003).

A pasteurização é um tratamento térmico convencional amplamente utilizado para assegurar a vida de prateleira dos sucos de frutas e garantir a inativação de patógenos nestes produtos (SANTHIRASEGARAM; RAZALI; SOMASUNDARAM, 2016). A aplicação de calor tem por objetivo inativar enzimas e reduzir o número de micro-organismos, ambos indesejáveis e que podem contribuir para a deterioração do produto (PENG et al., 2017). A segurança microbiológica nos sucos de fruta geralmente é alcançada através do uso de temperaturas elevadas (72 a 82 °C) durante curto período de tempo (0,3 a 15 segundos) (USFDA, 2004).

Embora a pasteurização seja o método mais simples e eficaz para a estabilização microbiológica dos alimentos, este procedimento causa alterações indesejáveis em vários parâmetros de qualidade, incluindo sabor e cor. Além disso, a pasteurização causa a desnaturação indesejável das proteínas, escurecimento não enzimático (Reação de Maillard) e a destruição de componentes nutricionais sensíveis ao calor (por exemplo, vitaminas) que comprometem o frescor desses produtos (HU et al., 2013; PENG et al., 2017; VEGARA et al., 2013).

Além do tratamento térmico, os conservantes químicos também são usados para prolongar a vida de prateleira (WALKER; PHILLIPS, 2008). Os conservantes químicos antimicrobianos são aditivos que impedem ou retardam as alterações provocadas por micro-organismos. A ação antimicrobiana dos conservantes baseia-se em efeitos sobre um ou mais dos seguintes componentes/atividades incluindo DNA, membrana plasmática, parede celular, síntese protéica, atividade enzimática, transporte de nutrientes (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2012). Para sucos de frutas, os conservantes mais utilizados e permitidos pela legislação brasileira são o ácido benzóico e seus sais de sódio, cálcio e potássio em concentração máxima de 0,05 g/100 mL; ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio em concentração máxima de 0,08 g/100 mL; e dióxido de enxofre em concentração máxima de 0,004 g/100 mL (BRASIL, 2007).

Os antimicrobianos sintéticos têm sido amplamente questionados quanto às implicações na saúde dos consumidores. O benzoato de sódio, sorbato de potássio e dióxido de enxofre, que são geralmente utilizados, podem ser tóxicos, carcinogênicos e responsáveis pela ocorrência de alergias (AMIRPOUR et al., 2015; TONIOLO et al., 2010). Além disso, os conservantes sintéticos podem favorecer o desenvolvimento de tolerância por parte dos micro-organismos, principalmente quando considerada a utilização de quantidades não letais na forma de obstáculos (ÁLVAREZ-ORDÓNEZ et al., 2009).

Uma vez que o tratamento térmico normalmente reduz a qualidade do produto e a frescura dos sucos, e os conservantes sintéticos têm sido cada vez mais rejeitados pelos consumidores, que cada vez mais demandam alimentos saudáveis, seguros e isentos de substâncias químicas, novas e efetivas tecnologias de conservação origem natural e segura têm sido exploradas (ANEJA et al., 2014b; FRANÇA et al., 2012; ZINOVIADOU et al., 2015). Dentre estas tecnologias, destaca-se o uso de óleos essenciais de plantas aromáticas, tratamentos térmicos moderados, campo elétrico pulsado e alta pressão hidrostática (AIT-OUAZZOU et al., 2013; ESPINA et al., 2011; PAGÁN et al., 2018).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES DE SUCOS DE FRUTAS

Nos últimos anos, a indústria de alimentos vem demonstrando crescente interesse pelo uso de compostos antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais, para atuar como conservantes de alimentos contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos (ASBAHANI et al., 2015). Óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de metabólitos secundários, geralmente lipofílicos, que podem ser amplamente classificados em alcalóides, flavonóides, isoflavonas, monoterpenos, ácidos fenólicos, carotenóides e aldeídos (DONSI; FERRARI, 2016; SEOW et al., 2014). Estes compostos, que são responsáveis pela fragrância das plantas e por muitas de suas atividades biológicas, podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou glandulares. A designação de “óleo” deve-se a algumas características físico-químicas destes produtos, como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. A principal característica dos OEs é a volatilidade, que os diferencia dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas geralmente obtidas de sementes (VOON; BHAT; RUSUL, 2012). OEs são caracterizados por possuírem dois ou três componentes majoritários, com concentração bastante elevada, quando comparados com os demais compostos presentes somente em traços (PRAKASH et al., 2015).

Os OEs são extraídos de plantas aromáticas cultivadas, na maioria das vezes, em países de clima temperado a quente. A produção desses óleos pode ser influenciada por diversos fatores ambientais (índice pluviométrico, temperatura, sazonalidade, tipo de solo, altitude e ciclo vegetativo da planta). Essa variação da produção e da composição química dos OEs também pode variar com os procedimentos de secagem das plantas de origem, época de colheita e tipo de adubação, entre outros fatores (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Entre os 3000 tipos de OEs conhecidos, atualmente, em torno de 300 são de interesse comercial (DIMA; DIMA, 2015).

Os registros históricos revelam que os OEs desempenham um papel notável na medicina tradicional. No entanto, a sua aplicação como aditivos alimentares tem sido explorada devido as suas fortes propriedades antimicrobianas e antioxidantes (CARVALHO et al., 2015; CALO et al., 2015; SOUSA GUEDES et al., 2016). As principais vantagens da aplicação de OEs como agentes antimicrobianos são o seu amplo espectro de atividade e seu baixo risco de induzir resistência microbiana, uma vez que seus diferentes compostos apresentam diferentes mecanismos de ação, o que dificulta a adaptação do micro-organismo (SOUZA, 2016).

A efetividade antimicrobiana dos OEs depende do tipo da planta, da concentração do óleo essencial, da composição e pH do substrato, da temperatura, do tipo e concentração do micro-organismo alvo (AIT-OUAZZOU et al., 2012; MANSO et al., 2015). Alguns autores, sugerem que a eficácia antimicrobiana dos OEs se deve também ao equilíbrio entre os componentes majoritários e aqueles que aparecem em menor proporção (RIahi et al., 2013). Acredita-se que o mecanismo de ação dos OEs envolva diferentes eventos celulares, incluindo a sensibilização da dupla camada fosfolipídica, com perturbação na função e na composição da membrana plasmática, a inativação do mecanismo enzimático, a inibição do transporte de elétrons para produção de energia e da síntese de componentes celulares, assim como o extravasamento de material citoplasmático, lise e por fim a morte celular (BURT, 2004; SOUZA, 2016).

Nas últimas décadas, os OEs obtidos a partir de plantas aromáticas da família Lamiaceae foram amplamente exploradas quanto à sua eficácia contra micro-organismos contaminantes de alimentos (PRAKASH et al., 2018). *Mentha piperita* L., uma planta medicinalmente importante pertence a família Lamiaceae, comumente conhecida como menta, é um híbrido de *M. spicata* L. e *M. aquatic* L que foi primeiramente cultivada pelos antigos egípcios e documentada na farmacopeia islandesa do século XIII. *M. piperita* é amplamente cultivada em áreas temperadas, particularmente na Europa, América do Norte e África do Norte, mas também é cultivada em todas as regiões do mundo. A planta da *M. piperita* L. possui de 50-90 cm de altura, folhas verdes escuras ou claras, curtas, oblongas e ovadas com suas margens finamente dentadas (BRIGGS, 1993; SINGH; SHUSHNI; BELKHEIR, 2015).

O óleo essencial de *M. piperita* L. (OEMP) é amplamente utilizado em todo o mundo para fins aromatizantes, cosméticos e medicinais e formado por uma mistura complexa de constituintes, tais como, mentol, isomentona e neomentol, normalmente em maiores quantidades, e outros componentes tais como, cariofileno, limoneno, pulegona e β -pineno em menores quantidades (SMAOUI et al., 2016).

O mentol, o principal constituinte do OEMP (30-50% do óleo), é uma substância cerosa, cristalina utilizada para diversos fins médicos, tais como, para aliviar irritação da pele, queimaduras solares e aliviar o congestionamento nasal enquanto a mentona é utilizada em perfumaria, como agente saborizante ou aromatizante (KUMAR et al., 2012). A atividade biológica do OEMP e do mentol tem sido objeto de uma série de estudos, pois possui atividades antimicrobianas e antivirais significativas, fortes ações antioxidantes e antitumorais (SKALICKA-WOŹNIAK; WALASEK, 2014). Os efeitos antimicrobianos do OEMP e do mentol estão associados à sua capacidade de causar perturbação da fração lipídica da membrana plasmática microbiana, induzindo alterações na permeabilidade e vazamento de materiais intracelulares (SCHELZ et al., 2006). Estudos acerca do potencial do OEMP como conservante têm sido realizados em matrizes alimentares como carnes (SMAOUI et al., 2016), frutas (GUERRA et al., 2015) e sucos de frutas (SOUSA GUEDES et al., 2016). Produtos de frutas, como polpa congelada e sucos não pasteurizados, contendo folhas de *Mentha* spp. estão disponíveis no mercado, e esses produtos são, muitas vezes, bem aceitos por causa de seu sabor característico e frescor. Assim, o OEMP pode representar uma tecnologia de conservação viável para garantir a segurança de sucos de frutas (SOUSA GUEDES et al., 2016).

Segundo Burt (2004), em alimentos de origem vegetal, a atividade antimicrobiana dos OEs é beneficiadas pelo baixo pH característico destes alimentos. Ainda, segundo Burt (2004), o baixo conteúdo de lipídios nnos alimentos pode contribuir para o sucesso da aplicação dos OEs, pois a presença de grande quantidade de lipídios pode limitar a interação dos compostos terpênicos hidrofóbicos dos OEs com as células bacterianas.

O OEMP é ativo contra micro-organismos contaminantes de alimentos, incluindo *E. coli* O157: H7 (DJENANE et al., 2012) e *S. Enteritidis* (VALERIANO et al., 2012), já relatados em surtos envolvendo sucos de frutas (KAHRAMAN et al., 2017; HARRIS et al., 2003; LEE et al., 2015). Estudos já demonstraram a eficácia do OEMP contra fungos e bactérias patogênicas em sucos de maçã, abacaxi, laranja, manga e cajú (KARAMAN et al., 2016; SOUSA GUEDES et al., 2016; TYAGI et al., 2013).

Apesar da eficácia antimicrobiana dos OEs, sua incorporação em sistemas alimentares como conservantes pode ser dificultada devido a baixa solubilidade em água e elevada volatilidade (DONSÌ; FERRARI, 2016; KUJUR et al., 2017). Sistemas de veiculação de OEs em produtos alimentares, como aqueles baseados em nanoemulsões são citados como estratégias para melhorar a dispersão de OEs em alimentos (PAGÁN et al., 2018; McCLEMENTS, 2012). As nanoemulsões de óleo em água (O/A) consistem em gotículas de óleo, com tamanho médio variando de 20 a 200 nm, disperso em meio aquoso e estabilizado por uma camada de emulsionante (DONSÌ; FERRARI, 2016; McCLEMENTS, 2012).

Diferente das emulsões, que são sistemas termodinamicamente instáveis que naturalmente tendem à separação física, nas nanoemulsões, as condições de estabilidade física são induzidas pelos efeitos do constante movimento browniano, permitindo que a mistura não sofra os efeitos gravitacionais. Desta forma, efeitos como floculação, sedimentação ou coalescência são evitados (McCLEMENTS; RAO, 2011). A medida que o tamanho das gotículas diminui, aumenta a atividade biológica dos compostos lipofílicos encapsulados em nanoemulsões, devido ao aumento do transporte de moléculas ativas através de membranas biológicas, bem como o aumento da relação superfície/volume, que resulta em uma maior reatividade (SALVIA-TRUJILLO et al., 2015). Portanto, a nanoencapsulação de OEs poderia oferecer vantagens, como facilidade de manuseio, estabilidade, proteção contra oxidação, melhora na distribuição, solubilidade, controle da liberação, com menor ou nenhum efeito adverso nas propriedades sensoriais (PRAKASH et al., 2018).

A aplicação combinada de nanoemulsões de OEs em conjunto com tecnologias tradicionais, como tratamento térmico moderado (PAGÁN et al., 2018), e com tecnologias emergentes, por exemplo com irradiação de raios gama, ozônio, ultravioleta (SEVERINO et al., 2014), alta pressão, luz pulsada (DONSÌ et al., 2015) ou com campo elétrico pulsado (PAGÁN et al., 2018) provavelmente contribuiria para aumentar a vida de prateleira dos produtos, preservando seus atributos de frescor (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Entretanto, são necessários estudos que evidenciem tais efeitos.

2.4 APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM COMBINAÇÃO COM OUTRAS TECNOLOGIAS DE CONSERVAÇÃO EM SUCOS DE FRUTAS

A segurança microbiológica e a estabilidade da maioria dos alimentos, bem como a qualidade nutricional e sensorial, podem ser alcançadas pela aplicação combinada de métodos

de conservação (LEISTNER, 1992). Como resultado, e com base na teoria dos obstáculos, várias pesquisas têm recomendado o uso combinado de tecnologias de conservação para manutenção da segurança e da qualidade dos alimentos (BEVILACQUA et al., 2013; MOSQUEDA-MELGAR; RAYBAUDI-MASSILIA; MARTÍN-BELLOSO, 2008a; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Quando estas tecnologias são aplicadas em combinações sinérgicas, o efeito da inativação microbiana supera a soma dos efeitos obtidos por cada tratamento isoladamente (MOSQUEDA-MELGAR; RAYBAUDI-MASSILIA; MARTÍN-BELLOSO, 2012).

Diversos estudos têm enfatizado que o uso combinado de OEs ou seus constituintes e outras tecnologias, como tratamento térmico moderado (TTM), campo elétrico pulsado (CEP) e alta pressão hidrostática (APH) apresenta-se como uma estratégia para inibir ou retardar o crescimento microbiano em sucos de frutas, e para evitar os problemas de efeitos sensoriais indesejados da aplicação dos OEs isolados (Quadro 1) (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016; CHERRAT et al., 2014; ESPINA et al., 2014). Estes efeitos indesejados ocorrem porque geralmente a concentração de OE efetiva contra as bactérias relacionadas aos sucos de frutas geralmente atinge o limiar de rejeição dos consumidores (SOUSA GUEDES et al., 2016).

Quadro 1 – Estudos que avaliam o efeito combinado de óleos essenciais e/ou seus constituintes individuais com outras tecnologias de conservação de sucos de frutas.

| Suco de fruta | Óleo essencial/ constituente | Tratamento combinado | Micro-organismo alvo | Referências |
|------------------|---|-------------------------------------|---|--------------------------------|
| Tomate | <i>Origanum vulgare</i> L. e <i>Thymus vulgaris</i> L. | APH (200 ou 400 MPa por 5 a 20 min) | Micro-organismos autóctones (bactérias ácido lácticas) | Mohácsi-Farkas et al. (2002) |
| Melão e melancia | <i>Cinnamon bark</i> | CEP (35 kV/cm) | <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. Enteritidis</i> e <i>L. monocytogenes</i> | Mosqueda-Melgar et al. (2008b) |
| Laranja | Citral e Vanillin | TTM (52, 57, 59 e 61 °C por 10 min) | <i>Listeria innocua</i> | Char et al. (2010) |

| | | | | |
|-------------------------------------|---|--|--|--|
| Maça e laranja | α -Pinene, β -pinene, <i>p</i> -cymene, thymol, carvacrol, borneol, linalool, terpineol-4-ol, 1,8-cineole, α -terpinyl acetate, camphor | TTM (54 °C por 10 min) e CEP (30 kV/cm; 25 pulsos) | <i>E. coli</i> O157:H7 | Ait-Ouazzou et al. (2011) |
| Maça, pera, laranja e morango | <i>Cinnamon bark</i> | CEP (35 kV/cm) | <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Escherichia coli</i> O157:H7 | Mosqueda- Melgar; Raybaudi- Massilia; Martín- Belloso (2012) |
| Maça | <i>Citrus lemon</i> L. | TTM (54 °C por 10 min) | <i>E. coli</i> O157:H7 | Espina et al. (2012) |
| Maça | <i>Mentha pulegium</i> L. e <i>Thymus</i> <i>algeriensis</i> L. | TTM (54 °C por 10 min) | <i>E. coli</i> O157:H7 | Ait-Ouazzou et al. (2012) |
| Maça, laranja e maçã | (+)-Limonene e <i>Citrus sinensis</i> L. | TTM (54 °C por 10 min) e CEP (30 kV/cm; 25 pulsos) | <i>E. coli</i> O157:H7 | Espina et al. (2013a) |
| Maça e laranja | (+)-Limonene, <i>Citrus sinensis</i> L. e <i>C. reticulata</i> L. | HPH (175 a 400 MPa por 5 a 20 min) | <i>E. coli</i> O157:H7 | Espina et al. (2013b) |
| Laranja | (+)-Limonene e <i>Citrus sinensis</i> L. | TTM (54 °C por 10 min) | <i>E. coli</i> O157:H7 | Espina et al. (2014) |
| Maça | Citral | TTM (53 °C por 15 min) e CEP (30 kV/cm) | <i>E. coli</i> O157:H7 | Pagán et al. (2018) |

APH – Alta pressão hidrostática; CEP – campo elétrico pulsado; TTM - Tratamento térmico moderado.

O TTM (40-60 °C) causa, muitas vezes, apenas injúria subletal. O TTM a 56 °C durante 5 min causou injúrias em 75,7 e 85,8% da população de *E. coli* O157:H7 em meio laboratorial (caldo tryptic soy) (JASSON et al., 2007). Também foi determinado um alto nível de lesão em culturas tratadas com calor leve de *Salmonella* Typhimurium (WUYTACK et al., 2003). Portanto, o TTM pode ser utilizado em combinação com outros métodos de conservação, por exemplo com OEs para obtenção de produtos seguros e que preservem os aspectos sensoriais (AIT-OUAZZOU et al., 2013; ESPINA et al., 2011). O dano induzido

pelo calor pode facilitar o acesso de compostos hidrofóbicos dos OEs à membrana citoplasmática, que é o principal local de ação de terpenos, ou pode permitir que os constituintes dos OEs sejam mais facilmente transportados para o interior a célula (AIT-OUAZZOU et al., 2011; SOMOLINOS et al., 2010).

Espina et al. (2012) avaliaram o potencial de aplicação de OE de limão (75 µL/L) em combinação com TTM (54 °C) para conservação de suco de maçã e concluíram que, nas condições ensaiadas, ocorreu efeito sinérgico capaz de reduzir 5 log₁₀ de *E. coli* O157:H7, sem qualquer interferência na aceitabilidade do suco. Efeitos sinérgicos foram também observados usando a combinação do TTM (54 °C e 60 °C) com 1,3 mM de carvacrol, na inativação de *E. coli* O157:H7. O uso combinado provocou, em média, uma diminuição do tempo para inativar 5 ciclos log₁₀ da bactéria em sucos de maçã, manga, tomate e laranja. Os efeitos do uso de 0,2 µL/mL dos OEs de *Mentha pulegium* L. e *Thymus algeriensis* L. em combinação com TTM (54 °C por 10 min) foram avaliados contra *E. coli* O157:H7 em sucos de maçã e laranja (AIT-OUAZZOU et al. 2011; AIT-OUAZZOU et al., 2012). Em suco de maçã observou-se uma redução de 8,2 e 5 log₁₀ de *E. coli* O157:H7, respectivamente. A inativação por meio do uso combinado foi mais rápida do que o tratamento térmico atuando sozinho (diferença de 27 min). Resultados semelhantes foram obtidos quando os mesmos experimentos foram realizados a 57 e 60 °C.

Estudos que tenham demonstrado a eficácia de nanoemulsões de OEs (ou de seus constituintes) combinados com TTM são escassos. Maté, Periago e Palop (2016) avaliaram a eficácia do D-limoneno (0,5 mM) nanoemulsificado combinado com TTM (45, 50, 52,5 e 55 °C) para inativar *L. monocytogenes* em meio laboratorial (caldo tryptic soy). Os autores observaram que *L. monocytogenes* apresentou resistência de duas a cinco vezes menor ao calor quando este foi aplicado em combinação com o D-limoneno comparado com o uso do calor isolado. Estes efeitos foram ainda mais intensos quando o D-limoneno foi usado sob a forma de nanoemulsão. Em contrapartida, Pagán et al. (2018) reportaram que a aplicação de calor (53 °C) em combinação com citral em suspensão requereu menor tempo para alcançar a inativação de 5 log₁₀ UFC/mL de *E. coli* O157:H7 em meio laboratorial e em suco de maçã, quando comparada a combinação de calor (53 °C) e citral nanoemulsionado.

Tecnologias de conservação não térmicas, como CEP, vem ganhando destaque nas últimas décadas (RUPASINGHE; YU 2012). Esta tecnologia consiste em submeter o produto a pulsos elétricos de alta intensidade (da ordem de 20 a 80 kV/cm) repetidos muitas vezes (constituindo o número de pulsos) durante intervalos de tempo muito pequenos (geralmente

de 1 a 10 μ s), podendo acontecer em batelada ou em um sistema de fluxo contínuo (BARBOSA-CÁNOVAS; RODRÍGUEZ, 2002; RASGOTI, 2003). O tratamento com CEP recebeu a aprovação da USFDA e atualmente é usado no processamento de alimentos em escala comercial (SOUZA; ALMEIDA; SOUSA GUEDES, 2016).

O CEP é uma das tecnologias não-térmicas mais estudadas para para inativação de micro-organismos em sucos de frutas e vegetais, bem como para manter as propriedades sensoriais e nutricionais semelhantes às do suco fresco (ROOBAB et al., 2018). O principal efeito do tratamento com CEP sobre os micro-organismos é a eletroporação da membrana celular, ou seja, aumento da permeabilidade da membrana celular sob a influência de um campo elétrico que envolve a célula (PAL, 2017; ROOHINEJAD et al., 2018). A formação de poros é um processo dinâmico e pode ser reversível ou irreversível dependendo da intensidade do tratamento. Quando os poros induzidos são pequenos em comparação com a área da membrana e são gerados com o tratamento com CEP em baixa intensidade, a permeabilização é reversível. A viabilidade da célula é mantida e a biossíntese adicional de metabólitos secundários pode ser desencadeada como resposta à condição de estresse induzida pelo tratamento com CEP. O aumento da intensidade do tratamento, por meio do aumento da força do campo elétrico e/ou o tempo de tratamento promove a formação de poros grandes e permeabilização é irreversível (NGADI, 2012).

A inativação microbiana pelo CEP depende de fatores que são críticos para o resultado do processo. Os fatores podem ser classificados como parâmetros do processo, parâmetros do produto e características microbianas (ROOBAB et al., 2018). Os principais parâmetros do processo que afetam a inativação microbiana pelo CEP são a força do campo elétrico, o comprimento do pulso, a forma do pulso (pulsos exponenciais ou de onda quadrada), o número de pulsos e a energia e a frequência do pulso (DE VITO; DONSI; FERRARI, 2005; HUANG et al., 2012). Em geral, o aumento da intensidade desses parâmetros melhora a inativação microbiana. Uma medição precisa desses parâmetros e uma distribuição uniforme do campo elétrico na câmara de tratamento são necessárias para obter dados de inativação confiáveis (WOUTERS; ALVAREZ; RASO, 2001). Os fatores relacionados ao produto, como a condutividade elétrica (é mais vantajoso trabalhar com produtos de baixa condutividade), o pH (baixos valores de pH favorecem a inativação) e a força iônica, e os relacionados ao micro-organismo, como a espécie, o estágio de crescimento, o tamanho da população e a forma das células microbianas, também são importantes para a eficiência da inativação (HUANG et al., 2012).

Estudos reportam o aumento da eficácia dessa técnica quando aplicada em combinação com OEs. Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia e Martín-Belloso (2012) observaram que, para inativar populações de *S. Enteritidis* e *E. coli* O157: H7 em mais de 5 \log_{10} em sucos de frutas foram necessárias combinações de tratamento de CEP (35 kV/cm) com 0,1% de OE de canela nos sucos de maçã e pera, e com 0,05% do mesmo OE em sucos de morango. Ait-Ouazzou et al. (2013) avaliaram o potencial da aplicação do carvacrol (1,3 mM) em combinação com CEP (30 kV/cm), visando a redução de 5 \log_{10} na contagem de *E. coli* O157:H7 em sucos de maçã, manga, laranja e tomate, e concluíram que a combinação dos tratamentos foi eficaz para alcançar a redução desejada em todos os sucos de frutas estudados. Pagán et al. (2018) observaram que a eficácia do uso de citral combinado com CEP (30 kV/cm) na inativação de *E. coli* O157: H7 em meios laboratoriais (pH 7 e 4) não apresentou diferenças significativas quando o citral foi usado em suspensão ou em nanoemulsão.

Assim como a tecnologia de CEP, alta pressão hidrostática (APH) tem sido descrita como uma tecnologia emergente que possui potencial para conservação de sucos de frutas "frescos" com vida de prateleira prolongada (ESPINA et al. 2013b; MOHÁCSI-FARKAS et al. 2002; RUPASINGHE; YU 2012). A APH é um método que consiste em expor os alimentos, líquidos ou sólidos, a pressão de 100 a 800 MPa. A temperatura do processo durante o tratamento pode ser controlada, podendo variar de < 0 °C até > 100 °C. Uma vantagem importante da APH em comparação à outras tecnologias é que os alimentos podem ser submetidos a alta pressão com ou sem embalagem, o que, no último caso, elimina a possibilidade de contaminação pós-tratamento. O tempo de exposição do alimento ao tratamento pode variar de pulsos de milisegundos a até mais que 20 min (TRIBST et al., 2011). No entanto, o tratamento de APH mais comum aplicado na indústria consiste em submeter o alimento a 400 MPa por 20 min (SAN MARTIN; BARBOSA-CANOVAS; SWANSON, 2002).

Um sistema típico de APH consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de um vaso pressurizado, utilizando um meio que transfere a pressão ao produto, geralmente água. Uma vez que a pressão desejada é atingida, a pressão pode ser mantida sem necessidade de energia adicional (BARBA et al., 2015). Um princípio fundamental subjacente à APH é o processo isostático que permite que todas as regiões do alimento sejam rapidamente expostas a uma pressão uniforme, independente do tamanho e geometria do produto alimentar, ao contrário do processamento térmico, onde o calor é gradualmente transferido através do

sistema alimentar (BALA; FARKAS; TUREK, 2008; HAYASHI et al., 1989; TAUSCHER, 1995).

O tratamento de APH é caracterizado por três parâmetros de processamento: temperatura, pressão e tempo de exposição. Esses parâmetros permitem uma grande flexibilidade na concepção do processo (HEINZ; BUCKOW, 2010). Os parâmetros de tratamento, as características inerentes aos micro-organismos e o ambiente em que estes se encontram determinam a eficácia da APH. As características intrínsecas dos alimentos, como o pH e a atividade de água também podem afetar a eficiência de inativação microbiana da APH. A maioria dos micro-organismos é mais suscetível a APH em ambientes de pH mais baixos, e ainda, células danificadas pela pressão têm menor probabilidades de sobreviver ao armazenamento posterior em ambientes ácidos (PAGÁN et al., 2001; WHITNEY et al., 2007).

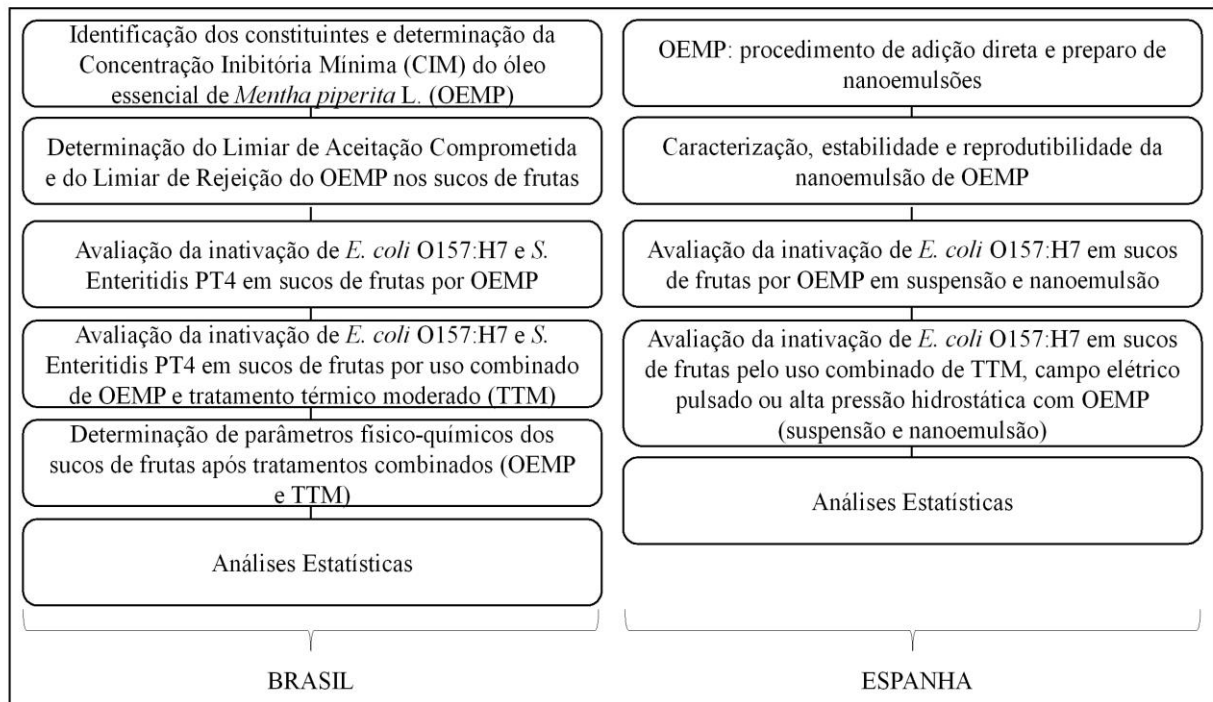
A APH afeta as membranas celulares bacterianas e prejudica sua permeabilidade e troca de íons e inativa algumas das enzimas vitais para a sobrevivência e reprodução de células bacterianas, enquanto compostos de baixo peso molecular, como vitaminas e compostos relacionados a pigmentação e aroma dos alimentos, permanecem inalterados (RASTOGI et al., 2007). Esta tecnologia mostrou atender ao requisito da USFDA de uma redução de 5 ciclos logarítmicos de micro-organismos em sucos de frutas, sem afetar negativamente seus atributos sensoriais e nutricionais (SAN MARTÍN et al., 2002). No entanto, a possibilidade de células bacterianas tratadas sob pressão serem reparadas durante o armazenamento deve ser considerada. Assim, a combinação com outras tecnologias, como o uso de OEs é importante para impedir a recuperação das células danificadas pela aplicação da APH (RAJKOVIC; SMIGIC; DEVLIEGHIERE, 2010).

Os efeitos da aplicação combinada de OE de *Citrus Citrus sinensis* L. *reticulata* L. e limoneno com APH (300 MPa por 20 min) foram avaliados frente *E. coli* O157:H7 em sucos de maçã e laranja (ESPINA et al., 2013b). A aplicação de APH isolada inativou menos de 0,5 log₁₀ da população inicial do patógeno (aproximadamente 7 log₁₀ UFC/mL), enquanto a adição de 200 µL/L dos óleos estudados resultou na inativação de aproximadamente 3 log₁₀ UFC/mL em suco de laranja e 1,5 a 2 log₁₀ UFC/mL em suco de maçã. A combinação de APH com 200 µL/L de limoneno causou uma redução de 5 log₁₀ UFC/mL da população inicial de *E. coli* O157: H7 em ambos os sucos. Até o presente, não foram realizados estudos com enfoque na aplicação combinada de nanoemulsões de OEs e seus constituintes com APH para conservação de sucos de frutas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em duas etapas distintas, sendo a primeira realizada no Brasil e a segunda etapa na Espanha, como apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Representação das atividades realizadas nas etapas do estudo conduzidas no Brasil e Espanha.



3.1 PRIMEIRA ETAPA

Os experimentos realizados na primeira etapa do estudo foram conduzidos no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba e no Núcleo de Caracterização e Análise (NUCAL) da Universidade Federal da Paraíba.

3.1.1 Óleo essencial de *Mentha piperita* L. (OEMP)

O óleo essencial de *Mentha piperita* L. (OEMP) (lote 187), extraído por destilação a vapor das folhas, foi obtido da empresa nacional Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vagem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Os dados relacionados ao óleo essencial, tais como nome, aparência, cor, odor, impurezas, densidade e índice de refração foram informados através de laudo técnico emitido pelo fornecedor (ANEXO A). As soluções do OEMP foram preparadas

em caldo infusão de cérebro e coração (CBHI, Himedia, Índia) em concentrações variando de 0,312 a 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, usando Tween 80 (1% v/v, Sigma-Aldrich, EUA) como emulsificante (LEITE et al., 2016).

3.1.2 Micro-organismos e condições de crescimento

As cepas de *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis PT4, isoladas de alimentos envolvidos em surtos, foram obtidas da Coleção de Micro-organismos de Referência de cepas epidêmicas de *Salmonella* do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN, Curitiba, Brasil). As cepas estoque de todas as bactérias ensaiadas foram mantidas em criotubos com caldo infusão de cérebro e coração (CBHI, Himedia, Índia) contendo glicerol (15 g/100 mL) (Himedia, Índia) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em placas contendo ágar infusão de cérebro e coração (ABHI, Himedia, Índia) e incubadas *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (18 h). Em seguida, uma única colônia foi cultivada em 5 mL de CBHI e cultivadas *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com agitação ($140 \times g$) por 18h, para atingir a fase de crescimento estacionário. A massa celular obtida foi colhida por centrifugação ($4.500 \times g$, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), lavada duas vezes em solução salina (NaCl 0,85 g/ 100 mL) estéril e re-suspensa em CBHI estéril. As suspensões bacterianas obtidas foram submetidas a diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) em CBHI. A leitura da densidade óptica (DO) a 625 nm (DO625) de cada diluição foi determinada em espectrofotômetro (Marte, Spectro 500). Em paralelo, para a determinação do número de unidades formadoras de colônias de cada diluição, um volume de 100 μL da suspensão de micro-organismos foi inoculado na superfície de placas de Petri contendo ABHI, e espalhado com auxílio de alça Drigalsky estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h, e, em seguida, a contagem do número de células viáveis foi determinada e expressa em UFC/mL. Com o número de colônias obtido e com o valor da DO de cada diluição, foi encontrado o valor de DO625 de 0,09 para ambas as cepas, correspondendo a, aproximadamente, 8 log UFC/mL (LEITE et al., 2016).

3.1.3 Sucos de Frutas

As frutas cajá (*Spondias mombim* L.), goiaba (*Psidium guajava* L.) e manga (*Mangifera indica* L.) foram adquiridas de um distribuidor local (João Pessoa, Brasil). As frutas foram selecionadas de acordo com sua homogeneidade de cor e forma, com ausência de

danos mecânicos e sinais visíveis de infecção. O °Brix das frutas foram determinados pelo método da AOAC (2016) e escolhido como parâmetro para identificação do estágio de maturação das mesmas. °Brix ≥ 8 , ≥ 6 e ≥ 10 foram considerados o estágio de maturação ideal para cajá, goiaba e manga, respectivamente, como preconiza a legislação vigente (BRASIL, 2003).

As frutas foram desinfetadas através da imersão em uma solução de hipoclorito de sódio (150 ppm; pH 7,2, ajustado usando NaOH a 0,1 mol/L) durante 5 min, lavadas com água destilada estéril e secas durante 30 min em uma cabine de biossegurança (Pachane, PA 410). Depois, as frutas foram descascadas de forma asséptica, cortadas em pequenos pedaços e trituradas usando um liquidificador doméstico (Britânia, Eletronic Inox Filter L66). As polpas de frutas foram armazenadas em sacos de polipropileno de 100 g, selados e armazenados a -18 °C. Quando necessário para os ensaios, os sucos de frutas foram preparados misturando 100 g da polpa de fruta com água destilada (razão 1: 1 v/v) usando um liquidificador doméstico (por 3 min). Os sucos obtidos foram centrifugados (12.500 x g, 15 min, 4 °C) para separar a polpa do líquido restante. Os sobrenadantes foram esterilizados por autoclave (121 °C por 15 min) e utilizados para os ensaios subsequentes (LEITE et al., 2016).

Os sucos de frutas utilizados na análise sensorial foram preparados 24h antes do teste. Após o preparo foi adicionado o OEMP na concentração final desejada e a qualidade microbiológica dos sucos foi avaliada seguindo os padrões sanitários estabelecidos pela Resolução RDC nº12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001), onde estabelece a pesquisa de Coliformes termotolerantes (45 °C) e *Salmonella* sp. As análises microbiológicas foram realizadas segundo metodologias descritas pela American Public Health Association (APHA, 2001). Os dados obtidos revelaram uma satisfatória qualidade sanitária do produto avaliado. Para a determinação dos parâmetros físico-químicos e dos limiares sensoriais, foram utilizadas amostras de suco não submetidas à autoclavagem.

3.1.4 Identificação dos constituintes do OEMP

A identificação dos constituintes do OEMP foi realizada por meio da utilização de Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas (Ultra Shimadzu, CGMS-QP2010). Os compostos foram separados em uma coluna RTX capilar[®]-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), de modo que a programação da temperatura do forno do cromatógrafo a gás foi iniciada a 60 °C, seguida de uma rampa de 3 °C/min até atingir 240 °C, concluindo em tempo de corrida equivalente a 60 min. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o gás hélio foi

utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 0,99 mL/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 Spectral Database (Versão 1.7). A quantificação dos voláteis foi obtida através da normalização das áreas dos voláteis e expressos em percentual de área (%) (GUERRA et al., 2015).

3.1.5 Determinação da concentração inibitória mínima do OEMP

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OEMP foi determinada através do método de microdiluição em caldo em microplaca, de acordo com a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

Inicialmente, o inóculo bacteriano (8 log UFC/mL) foi diluído (1:100) em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril, resultando em um inóculo de, aproximadamente, 6 log UFC/mL. Um volume de 50 µL do inóculo obtido foi adicionado a cada poço contendo 50 µL de CBHI adicionado de diferentes concentrações de OEMP, variando de 20 a 0,312 µl/mL. Simultaneamente, foi preparado o controle de crescimento (positivo) e de esterilidade (negativo). O sistema foi agitado e incubado a 37 °C por 24 h, envolto com filme plástico para evitar a desidratação microbiana e garantir que não houvesse a volatilização do OEMP. Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina (0,01%) (Inlab, Brasil), preparada em solução aquosa, em todos os poços. A microplaca foi reincubada a 37 °C por 20 min, quando então foi realizada a leitura visual. 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. A CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento das cepas, ou seja, a menor concentração do óleo essencial capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa (SOUSA GUEDES et al., 2016). Os testes foram realizados em triplicata.

A partir da determinação dos valores de CIM do OEMP foram escolhidas as concentrações utilizadas para a determinação dos limiares sensoriais do OEMP em sucos de frutas.

3.1.6 Determinação dos limiares sensoriais do OEMP em sucos de frutas: limiar de aceitação comprometida (LAC) e limiar de rejeição (LR)

O limiar de aceitação comprometida (LAC) e de rejeição (LR) do OEMP nos sucos de cajá, goiaba e manga foram determinados seguindo a metodologia descrita por Lima Filho et al. (2015). As análises sensoriais foram realizadas após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal da Paraíba (protocolo 1.125.993 /2015; APÊNDICE A). Um total de 50 provadores não treinados (18 a 60 anos) que descreveram o consumo de sucos de frutas pelo menos duas vezes por semana foram selecionados. Os testes sensoriais incluíram cinco sessões de testes de aceitação (APÊNDICE C) (STONE; BLEIBAUM; THOMAS, 2012) e foram realizados em cabines individuais. Em cada sessão de aceitação foram servidas aos provadores duas amostras, das quais uma foi a amostra controle (suco de fruta sem OEMP) e a outra foi uma das amostras estímulo (suco de fruta adicionado de OEMP a 0,16, 0,31, 0,63, 1,25, ou 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Os sucos, refrigerados, preparados com 24h de antecedência, foram apresentados por ordem decrescente de concentração de OEMP, e a posição da amostra de estímulo dentro de cada par foi aleatória (Figura 2).

Desta forma, os provadores foram convidados a comparar as amostras, prová-las da esquerda para a direita e atribuir uma pontuação em relação à aceitação de cada uma das duas amostras utilizando, para isso, uma escala hedônica de nove pontos (variando de 1 = “desgostei muitíssimo” a 9 = “gostei muitíssimo”). Após cada sessão, os provadores foram orientados a consumir bolachas de baixo teor de sal e água para limpar os seus paladares entre as amostras avaliadas. Respeitando um intervalo de 5 mim, foi servido um novo par de amostras de suco de frutas.

Figura 2 - Ordem de apresentação das amostras em cada sessão de avaliação sensorial.



CTR (controle) – suco de fruta sem adição de OEMP.

3.1.7 Avaliação da inativação de *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis* PT4 em sucos de frutas por OEMP

A inativação de *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis* PT4 causada pelas diferentes concentrações de OEMP (0,16, 0,31, 0,63, 1,25 µL/mL) nos sucos de cajá, goiaba e manga foi avaliada durante 24 h de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C). As suspensões bacterianas testadas foram inoculadas em amostras de sucos de frutas contendo OEMP, nas concentrações testadas, para atingir uma população celular final de $7 \log_{10}$ UFC/mL. Os diferentes sistemas foram agitados suavemente por 30s e incubados sob refrigeração. Nos intervalos de 0 (imediatamente após a homogeneização), 1, 2, 4, 8, 12 e 24h de armazenamento, uma alíquota de 100 µL de cada sistema foi diluída seriadamente em solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL) e, em seguida, 20 µL de cada diluição foram inoculados, utilizando a técnica de microgota, em ABHI (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK 2001). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48h e os resultados foram expressos em \log_{10} UFC/mL. Os sistemas controle, que compreendem suco de fruta sem OEMP, foram ensaiados de forma semelhante. O limite de detecção foi de $2 \log_{10}$ UFC/mL para todas os ensaios e cepas testadas.

3.1.8 Avaliação da inativação de *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis* PT4 em sucos de frutas por uso combinado de OEMP e tratamento térmico moderado (TTM)

A inativação de *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis* PT4 causada pelas diferentes concentrações de OEMP (0,16, 0,31, 0,63 µL/mL) em combinação com TTM (54 °C) após 8, 10 e 12 min de exposição foi avaliada como descrito por Espina et al. (2012). Os intervalos de tempo de exposição e a temperatura utilizada foram selecionados com base em resultados de estudos anteriores utilizando combinações de OEs e TTM para conservar sucos de frutas (ESPINA et al., 2011; ESPINA et al., 2012). Alíquotas de 5 mL de sucos de frutas contendo as suspensões bacterianas ($7 \log_{10}$ UFC/mL) e OEMP nas concentrações testadas foram colocadas em banho-maria (modelo TE-053, Tecnal, Brasil), sob agitação e com termostato, a 54 °C. O OEMP foi adicionado uma vez que o meio de tratamento foi aquecido e antes da inoculação microbiana. Após 8, 10 e 12 min a 54 °C, uma alíquota de 100 µL de cada amostra de suco de fruta foi diluída seriadamente em solução salina estéril (NaCl 0,85 g/100 mL) e, em seguida, 20 µL de cada diluição foram inoculados, utilizando a técnica de microgota, em ABHI (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK 2001). As placas foram incubadas a 37 °C

por 24 a 48h e os resultados foram expressos em \log_{10} UFC/mL. Os sistemas controle, que compreendem suco de fruta sem OEMP, foram ensaiados de forma semelhante, para avaliar os efeitos do tratamento térmico sozinho sobre a sobrevivência bacteriana nos diferentes intervalos de tempo monitorados. O limite de detecção foi de $2 \log_{10}$ UFC/mL para todas os ensaios e cepas testadas.

3.1.9 Determinação de parâmetros físico-químicos dos sucos de frutas após tratamentos combinados (OEMP e TTM)

Para avaliar se o OEMP (0,16, 0,31, 0,63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) em combinação com TTM (54 °C; 12 min) afeta os parâmetros físico-químicos dos sucos de frutas, foram analisados os parâmetros °Brix, pH e acidez titulável no tempo zero, logo após o tratamento combinado e após 24h de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C) por meio da utilização de métodos padrão (AOAC, 2016). Esses parâmetros atendem o atual padrão físico-químico para sucos de frutas não açucarados (BRASIL, 2003). O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado utilizando um refratômetro digital (Hanna Instruments, modelo HI 96801) (AOAC, 2016; nº 932.12). Os valores de pH foram determinados utilizando um potenciômetro digital (Quimis, modelo Q400AS) (AOAC, 2016; nº 981.12). A acidez titulável foi determinada usando fenolftaleína como um indicador com NaOH a 0,1 mol/L, e os resultados foram expressos em gramas por 100 mL de equivalentes de ácido cítrico (AOAC, 2016; nº 942.15).

3.1.10 Análise estatística

Para ensaios de determinação de CIM, os resultados foram expressos como valores modais porque os valores de CIM foram os mesmos em todas as repetições (SOUSA GUEDES et al., 2016). Para os resultados de ensaios que mediram a sobrevivência bacteriana (contagem de células viáveis) e parâmetros físico-químicos, foram realizadas análises estatísticas para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) utilizando ANOVA seguido do teste de Tukey ou teste t de Student. As barras de erro nas figuras indicam a média \pm desvio padrão dos dados obtidos de pelo menos três experimentos independentes.

Para os resultados sensoriais, a determinação do LAC para cada sessão foi realizada usando o teste t pareado entre a nota hedônica da amostra controle (NHAC) e a nota hedônica da amostra estímulo (NHAE) (diferença: NHAC - NHAE). Com os valores t obtidos, foi elaborado um gráfico do valor t de cada sessão (eixo Y1) em função das concentrações de

OEMP em estudo (eixo X). O ponto em que a aceitação começa a ser comprometida, ou seja, a região em que começa a ocorrer diferença significativa entre as amostras quanto à aceitação foi representado no gráfico por uma linha tracejada, referente ao valor t tabelado. Para determinação do LR do OEMP nos sucos de frutas, no mesmo gráfico de determinação do LAC, foi inserido um segundo eixo Y (Y2), referente à nota hedônica média das amostras estímulo (NHAE). O ponto de corte deste eixo Y2, ponto de transição entre a aceitação sensorial e a rejeição dos sucos de frutas, foi representado no gráfico por uma linha tracejada, referente à nota hedônica 5 (termo hedônico “indiferente”). A categoria “indiferente” da escala hedônica foi considerada rejeição porque um consumidor indiferente a um produto dificilmente se mostrará disposto a comprá-lo (DELLA LUCIA et al., 2014).

Para determinar os valores de LAC e LR, modelos de regressão foram ajustados para os pontos do gráfico (pontos do eixo Y1 = LAC; pontos do eixo Y2 = LR). A qualidade dos modelos gerados foi determinada a partir do significado dos coeficientes de regressão e do coeficiente de determinação (r^2) ($SS_{\text{regression}}/SS_{\text{total}}$). A partir da equação do modelo, o LAC foi calculado considerando o valor t calculado igual ao valor t padrão ($p = 0,05$) ($Y1 =$ valor t tabulado) e o LR foi calculado considerando o ponto onde a pontuação hedônica média se torna "indiferente", igual a 5 na escala hedônica ($Y2 = 5$) (LIMA FILHO et al., 2015). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software de computador Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia).

3.2 SEGUNDA ETAPA

Na segunda etapa do estudo, os experimentos foram realizados durante o Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES, Processo N° 88881.134436/2016-01) no Laboratório de Novas Tecnologias de Processamento de Alimentos do Departamento de Produção Animal e Ciência dos Alimentos da Universidade de Zaragoza (UNIZAR/Espanha).

3.2.1 Micro-organismo e condições de crescimento

Escherichia coli O157:H7 (VTEC - fago tipo 34) isolada pelo Dr. Chapman (CHAPMAN et al., 1993) foi utilizada como cepa teste nesse estudo. A cultura estoque foi mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em criotubos com caldo tryptic soy (Biolife, Itália) contendo glicerol (15 g/100 mL) (Biolife, Itália) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A cepa teste foi inicialmente cultivada em placas contendo ágar tryptic soy (Biolife, Itália) adicionadas de 0,6% de extrato de levedura (Biolife, Itália) (ATSEL) e incubadas *overnight* a 37 °C (18 – 24h). Em seguida, uma única colônia foi cultivada em 5 mL de caldo tryptic soy adicionadas de 0,6% de extrato de levedura (CTSEL) e cultivada *overnight* a 37 °C sob agitação (140 x g; Selecta, modelo Rotabit) a 37 °C por 18h, para atingir a fase de crescimento estacionário. A massa celular obtida foi colhida por centrifugação (4.500 x g, 15 min, 4 °C), lavada duas vezes em solução salina (NaCl 0,85 g/100 mL) estéril e re-suspensa em CTSEL para obter suspensões celulares padrão com uma densidade óptica (DO) a 625 nm (DO₆₂₅) de 0,09, que proporcionou contagens viáveis de aproximadamente 8 log₁₀ UFC/mL (LEITE et al., 2016). Antes dos experimentos, as células foram re-centrifugadas e re-suspendidas a uma concentração de 7 log₁₀ UFC/mL em sucos de frutas com ou sem OEMP. Essa concentração bacteriana inicial foi escolhida de modo a proporcionar uma quantidade de células viáveis que permite medir uma redução ≥ 5 log₁₀ do patógeno teste nas condições analisadas.

3.2.2 Sucos de frutas

Nos ensaios realizados na Unizar (Zaragoza, Espanha), as frutas goiaba e manga foram adquiridas da empresa Fruit CMR, SA (Barcelona, Espanha). As frutas foram selecionadas observando a forma e cor uniformes, com ausência de danos mecânicos e sinais visíveis de infecção. O °Brix ≥ 6 e ≥ 10 foram considerados o estágio de maturação ideal para goiaba e manga, respectivamente (BRASIL, 2003). Os sucos de goiaba e manga foram preparados conforme descrito no item 4.1.3.

3.2.3 OEMP: procedimento de adição direta e preparo de nanoemulsões

O OEMP utilizado nesse estudo foi obtido da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vagem Grande Paulista, São Paulo, Brasil), conforme descrito no item 4.1.1. As suspensões do OEMP (s-OEMP), nas concentrações aceitas sensorialmente (0,16, 0,31 e 0,63 µL/mL), obtidas na primeira etapa do estudo, foram preparadas por um método vigoroso de agitação (FRIEDMAN et al., 2002) em sucos de goiaba e manga.

As nanoemulsões de OEMP (n-OEMP) foram preparadas com base no método de inversão de fase catastrófica (ZHANG et al., 2017), também conhecido como o método de inversão de fase de emulsão, do inglês, emulsion phase inversion (EPI). As n-OEMP foram

preparadas a partir de uma mistura de fase oleosa por adição lenta de fase aquosa com agitação magnética suave. A fase aquosa foi preparada misturando 1,5 mL de etanol (Sigma-Aldrich, EUA) com 40,5 mL de água destilada estéril (PAGÁN et al., 2018). A fase oleosa foi preparada misturando 3 mL de Tween 80 (Panreac, Barcelona, Espanha) com 5 mL de OEMP. A fase aquosa foi adicionada a fase oleosa em uma velocidade constante de, aproximadamente, 1 mL/min. Inicialmente foi formada uma emulsão de água em óleo (A/O) com uma proporção de óleo para água elevada. Depois, com agitação contínua, foi aumentando progressivamente a quantidade de água adicionada a emulsão A/O, até que ocorreu uma inversão de fase e uma emulsão óleo-em-água (O/A) foi formada. A concentração final de OEMP na nanoemulsão foi de 90 g/L.

3.2.4 Caracterização, estabilidade e reprodutibilidade da n-OEMP

As n-OEMP foram caracterizadas por tamanho da gota e índice de polidispersão (PDI) usando um analisador de tamanho de partícula (Brookhaven, 90 Plus). O tamanho da gota foi analisado usando a técnica de dispersão de luz dinâmica. Antes dos experimentos, n-OEMP foi diluída com água para eliminar os efeitos de espalhamento múltiplo. O tamanho da gota da nanoemulsão foi estimado por uma média de três medidas e é apresentado como o diâmetro médio da distribuição de volume. O tamanho da gota foi avaliado após a preparação fresca e depois após 1 e 4 meses de armazenamento a 4 °C. A reprodutibilidade do protocolo para a preparação de n-OEMP e a sua estabilidade durante 30 dias também foi avaliada comparando-se as curvas de inativação de *E. coli* O157:H7 (obtidas semanalmente) na presença de n-MPEO. As suspensões bacterianas foram adicionadas em concentrações finais de 7 log₁₀ UFC/mL em suco de manga com 5 µL/mL de n-MPEO. Os diferentes sistemas foram agitados suavemente por 30s e mantidos à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). As amostras foram retiradas a intervalos predefinidos e os sobreviventes foram enumerados.

3.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana s-OEMP e n-OEMP

A Concentração Inibitória Mínima do OEMP (s-OEMP e n-OEMP) foi determinada através do método de microdiluição em caldo em microplaca, de acordo com a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), conforme descrito no item 4.1.5.

Para avaliar o efeito de s-OEMP e n-OEMP na inativação *E. coli* O157:H7, suspensões bacterianas foram adicionadas em concentrações finais de $7 \log_{10}$ UFC/mL nos sucos de goiaba e manga com s-MPEO e n-MPEO a $5 \mu\text{L/mL}$. Os diferentes sistemas foram agitados suavemente por 30s e mantidos à temperatura ambiente ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Em intervalos de 0 (imediatamente após a homogeneização), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 min de tratamento, foram colhidas amostras e os sobreviventes foram enumerados.

3.2.6 Aplicação combinada de TTM, CEP ou APH com OEMP

3.2.6.1 TTM e OEMP

A inativação de *E. coli* O157:H7 causada pelas diferentes concentrações de s-OEMP ou n-OEMP (0,16, 0,31 e $0,63 \mu\text{L/mL}$) em combinação com TTM (50, 52 e $54 \text{ }^\circ\text{C}$) após 10 min de exposição foi avaliada. Os intervalos de tempo de exposição e a temperatura foram selecionados com base em resultados de estudos anteriores usando a combinação de OEs e TTM para conservar sucos de fruta (ESPINA et al., 2011; ESPINA et al., 2012). Alíquotas de 5 mL de suco de fruta contendo as suspensões bacterianas ($7 \log_{10}$ UFC/ mL) e s-OEMP ou n-OEMP nas concentrações testadas foram colocadas em banho-maria, sob agitação e com termostato, a $50, 52 \text{ e } 54 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$. O OEMP foi adicionado uma vez que o meio de tratamento foi aquecido e antes da inoculação microbiana. Os sistemas que compreendem suco de fruta sem s-OEMP ou n-OEMP foram realizados de forma semelhante. Após os tratamentos, as suspensões foram colhidas, colocadas imediatamente no gelo, e os sobreviventes enumerados.

3.2.6.2 CEP e OEMP

Os tratamentos de CEP foram realizados utilizando o equipamento ScandiNova (Modulator PG, ScandiNova), descrito por Saldaña et al. (2010). Foi colocada uma alíquota de 0,5 mL das suspensões bacterianas preparadas em sucos de goiaba e manga (condutividade elétrica de 1,9 e $1,2 \text{ mS/cm}$, respectivamente) com e sem s-OEMP ou n-OEMP (0,16, 0,31 e $0,63 \mu\text{L/mL}$) na câmara de tratamento com uma seringa estéril. Os impulsos em forma de onda exponencial em uma intensidade de campo elétrico de 20, 25 e 30 kV/cm e uma taxa de repetição de pulso de 1 Hz foram utilizados neste estudo. A energia específica de cada pulso foi de $2,3 \text{ kJ/kg}$, $3,6 \text{ kJ/kg}$ e $5,1 \text{ kJ/kg}$ em suco de goiaba e $1,4 \text{ kJ/kg}$, $2,3 \text{ kJ/kg}$ e $3,2 \text{ kJ/kg}$ em suco de manga, respectivamente. As amostras foram tratadas por 50 pulsos (largura de

pulso 3 μ s). As experiências começaram a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e em todas as experiências, a temperatura das amostras após a aplicação de 50 pulsos foi inferior a 35 °C. Após o tratamento, foram colhidas amostras, e os sobreviventes foram enumerados.

3.2.6.3 APH e OEMP

Os tratamentos de APH foram realizados seguindo um procedimento descrito anteriormente por Espina et al. (2013b). As suspensões bacterianas (1 mL cada) preparadas em em sucos de goiaba e manga com e sem s-OEMP ou n-OEMP (0,16, 0,31 e 0,63 μ L/mL) foram colocadas em bolsas de plástico estéril que foram seladas a quente e mantidas em gelo antes da pressurização. As suspensões bacterianas foram tratadas em um recipiente de pressão de 300 mL (Stansted Fluid Power, S-FL-085-9-W) à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). O fluido transmissor de pressão era monopropileno glicol-água (30:70). As suspensões bacterianas foram expostas a pressões de 150, 200 e 300 MPa durante 15 min. A temperatura máxima atingida durante a pressurização foi de 30 °C. Após a descompressão, as bolsas foram removidas da unidade e colocadas em gelo até que os sobreviventes fossem enumerados.

3.2.7 Contagens de células viáveis

Para enumerar os sobreviventes, após os tratamentos, uma alíquota de 100 μ L de cada suspensão bacteriana foi diluída adequadamente em água peptonada a (0,1 g/ 100mL) e, em seguida, 20 μ L de cada diluição foram inoculados em ATSEL utilizando a técnica da microgota (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK 2001). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24h. As amostras controle, inoculadas sem s-MPEO ou n-MPEO, foram ensaiadas de forma semelhante. Placas inoculadas com alíquotas colhidas a partir de amostras de suco contendo OEMP foram incubadas durante 24h adicionais em comparação com alíquotas colhidas de amostras controle. Experimentos anteriores mostraram que tempos de incubação mais longos não influenciaram a contagem de células sobreviventes. Os resultados foram expressos como \log_{10} UFC/ mL. O limite de detecção foi de $2 \log_{10}$ UFC/mL para todos os ensaios e cepas testadas.

3.2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas para determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$) utilizando ANOVA seguido de teste post-hoc de Tukey ou teste t de Student. Para os

ensaios de determinação da CIM, os resultados foram expressos como valores modais porque os valores da CIM foram iguais em todas as repetições. As barras de erro nas figuras indicam a média \pm desvio padrão dos dados obtidos de pelo menos três experimentos independentes. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software de computador Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia).

REFERÊNCIAS

- AIT-OUAZZOU, A.; CHERRAT, L.; ESPINA, L.; LORÁN, S.; ROTA, C.; PAGÁN, R. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 12, n. 3, p. 320-329, 2011.
- AIT-OUAZZOU, A.; ESPINA, L.; CHERRAT, L.; HASSANI, M.; LAGLAOUI, A.; CONCHELLO, P.; PAGÁN, R. Synergistic combination of essential oils from Morocco and physical treatments for microbial inactivation. **Innovative Food Science and Emerging**, v. 16, n. 1, p. 283–290, 2012.
- AIT-OUAZZOU, A.; ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 159-167, 2013.
- ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; FERNÁNDEZ, A.; BERNARDO, A.; LÓPEZ, M. A comparative study of thermal and acid inactivation kinetics in fruit juices of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Senftenberg grown at acidic conditions. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1147-1155, 2009.
- AMARIZ, A. **Caracterização, compostos bioativos e potencial antioxidante de subprodutos do processamento de frutas no submédio do vale do são francisco**. 2015. 141 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.
- AMIRPOUR, M.; ARMAN, A.; YOLMEH, A.; AKBARI-AZAM, M.; MORADIKHATOONABADI, Z. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 2, p. 142–148, 2015.
- ANEJA, K. R.; DHIMAN, R.; AGGARWAL, N. K.; KUMAR, V.; KAUR, M. Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. **International Journal of Food Science**, v. 2014, n. 1, p. 1–7, 2014a.
- ANEJA, K. R.; DHIMAN, R.; AGGARWAL, N. K.; ANEJA, A. Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. **International Journal of Food Science**, v. 2014, n. 1, p. 1–14, 2014b.
- ASBAHANI, A. E.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: from extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1, p. 220-243, 2015.
- ASSOCIAÇÃO EUROPEIA DE SUCOS DE FRUTAS. **Relatório de mercado**. 2016. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/AIJN_Market_Report_por-BR\(002\).pdf](http://www.citrusbr.com/download/biblioteca/AIJN_Market_Report_por-BR(002).pdf)> Acesso em 10 de jan. 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL – AOAC. Official Methods of Analysis of Official Methods of Analysis of the Association of Official

Analytical Chemist. Method No. 932.12, Method No. 981.12, Method N. 942.15. 18 ed. Washington: AOAC International, 2016.

BALA, B.; FARKAS, D.; TUREK, E. J. Preserving foods through high-pressure processing. **Food Technology**, v. 62, n. 11, p. 32-38, 2008.

BAPTISTA, I.; ROCHA, S. M.; CUNHA, A.; SARAIVA, J. A.; ALMEIDA, A. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: an overview. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, n. 1, p. 128-149, 2016.

BARBA, F. J.; TEREFE, N. S.; BUCKOW, R.; KNORR, D.; ORLIEN, V. New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. **Food Research International**, v. 77, n. 4, p. 725-742, 2015.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; RODRÍGUEZ, J. J. Update on non-thermal food processing technologies: Pulsed electric field, high hydrostatic pressure, irradiation and ultrasound. **Food Australia**, v. 54, n. 11, p. 513-520, 2002.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12, de 04 de setembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade Gerais para Suco Tropical; os Padrões de Identidade e Qualidade dos Sucos Tropicais de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Mangaba, Maracujá e Pitanga; e os Padrões de Identidade e Qualidade dos Néctares de Abacaxi, Acerola, Cajá, Caju, Goiaba, Graviola, Mamão, Manga, Maracujá, Pêssego e Pitanga. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 set. 2003.

BRASIL. 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.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 5, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre “Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16.2: Bebidas Não Alcoólicas, Subcategoria 16.2.2: Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e Não Gaseificadas”. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jan. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Seção 1, p. 45-53.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Alimentos regionais brasileiros / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRIGGS, C. Peppermint: medicinal herb and flavouring agent. **Canadian Pharmacists Journal**, v. 126, p. 89-92, 1993.

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.

CALLEJÓN, R. M.; RODRÍGUEZ-NARANJO, M. I.; UBEDA, C.; HORNEDO-ORTEGA, R.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European union: Trends and causes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 1, p. 32-38, 2015.

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

CARMO, M. C. L.; DANTAS, M. I. S.; RIBEIRO, S. M. R. Characterization of the ready to drink juice consumer market. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 305-309, 2014.

CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A.; BECKMAN, J. C. Estudo da estabilidade de polpas de frutas tropicais mistas congeladas utilizadas na formulação de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n.1, p. 1-9, 2017.

CARVALHO, R. J.; SOUZA, G. T.; HONÓRIO, V. G.; SOUSA, J. P.; CONCEIÇÃO, M. L.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 59-65, 2015.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC. 2016. **Foodborne Outbreak Online Database (FOOD)**. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> Acesso em 5 abr. 2017.

CEBRIÁN, G.; SAGARZAZU, N.; AERTSEN, A.; PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; MANÑAS, P. Role of the alternative sigma factor rB on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n.1, p. 187–196, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Foodborne Outbreak Online Database (FOOD)**. 2016 Disponível em: [<https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>](https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/) Acesso em 5 oct. 2017.

CERNY, G.; HENNICH, W.; PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by bacilli; isolation and characterization of the spoiling microorganism. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 179, n. 3, p. 224-227, 1984.

CHAPMAN, P. A.; SIDDON, C. A.; WRIGHT, D. J.; NORMAN, P.; FOX, J.; CRICK, E. Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. **Epidemiology & Infection**, v. 111, n. 3, p. 439-447, 1993.

CHAR, C. D.; GUERRERO, S. N.; ALZAMORA, S. M. Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 5, p. 752-61, 2010.

CHERRAT, L.; ESPINA, L.; BAKKALI, M.; PAGAN, R.; LAGLAOUI, A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. **Innovative Food Science & Emerging technologies**, v. 22, n. 1, p. 221-229, 2014.

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

COSTA, L. C.; SANTOS, L. R.; FRANÇA, R.; DAVINI, G.; SHIRAI, M. A. Aplicação de diferentes revestimentos comestíveis na conservação pós-colheita de goiabas (*Psidium guajava* L.). **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n. 2, p. 16-31, 2017.

CRONAN, J. E. Phospholipid modifications in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n.2, p. 202-205, 2002.

DE VITO, F.; DONSI, G.; FERRARI, G. Effects of Pulsed Electric Field on permeabilization of cell membranes of fruits and vegetables. **Innovations in Traditional Foods**, v. 2, n. 1, p. 1515-1518, 2005.

DELLA LUCIA, S. M.; MINIM, V. P. R.; SILVA, C. H. O.; MINIM, L. A.; CIPRIANO, P. A. Use of relative risk test to evaluate the influence of the brand on beer acceptability. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 2267-2276, 2014.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, n. 1, p. 29-35, 2015.

DJENANE, D.; AIDER, M.; YANGUELA, J.; IDIR, L.; GÓMEZ, D.; RONCALÉS, P. Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. **Meat Science**, v. 92, n.4, p. 667-674, 2012.

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, n. 1, p. 106-120, 2016.

DONSI, F.; MARCHESE, E.; MARESCA, P.; PATARO, G.; VU, K. D.; SALMIERI, S.; LACROIX, M.; FERRARI, G. Green beans preservation by combination of a modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing. **Postharvest Biology and Technology**, v. 106, n. 1, p. 21-32, 2015.

- ESPINA, L. GELAW, T. K.; LAMO-CASTELLVÍ, S.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes. **PloS One**, v. 8, n.2, p. 1- 10, 2013a.
- ESPINA, L.; CONDÓN, S.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Synergistic effect of orange essential oil or (+)- limonene with heat treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice at lower intensities while maintaining hedonic acceptability. **Food Bioprocess and Technology**, v. 7, n. 8, p. 471-481, 2014.
- ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; LAGLAOUI, A.; MACKEY, B. M.; PAGÁN, R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 23–30, 2013b.
- ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; AIT-OUAZZOU, A.; CONDÓN, S.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 1, p. 9–16, 2012.
- ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.
- EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Soft drinks in Brazil: industry overview**. 2017a. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/>> Acesso em 10 jan. 2018.
- EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Statistics**. 2017b. Disponível em: <<https://www.portaleuromonitor.com/portal/statistics/tab>> Acesso em 10 jan. 2018.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–165, 2015.
- FARDSANEI, F.; DALLAL, M. M. S.; DOURAGHI, M.; SALEHI, T. Z.; MAHMOODI, M.; MEMARIANI, H.; NIKKHAHI, F. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, n. 1, p. 451-456, 2017.
- FERREIRA, J. A. F. **Panorama das doenças transmitidas por Alimentos no Brasil entre 2000 e 2015**. 2017. 76 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde Pública), Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Dossiê conservantes**. Editora Insumos, São Paulo, n. 18, p. 28-51, ago., 2011b. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/247.pdf>>. Acesso em 11 jan. 2018.

FORATO, L. A.; BRITTO, D.; RIZZO, J. S.; GASTALDI, T. A.; ASSIS, O. B. G. Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 5, n. 1, p. 68-74, 2015.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 496 p.

FRANÇA, F. C. O.; MENDES, A. C. R.; ANDRADE, I. S.; RIBEIRO, G. S.; PINHEIRI, I. B. Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro. In: SEMINÁRIO ALIMENTAÇÃO E CULTURA NA BAHIA, 2012, Bahia. **Anais...** Bahia: UNEB, p. 1-7.

FRANÇA, P. R. L.; SILVA, J. C.; PORTO, T. S. Clarificação do suco de cajá (*Spondias mombin* L.) utilizando pectinases de *Aspergillus aculeatus* URM4953. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 12-16, 2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n.1, p. 1545-1560, 2002.

GUERRA, I. C. D.; OLIVEIRA, P. D. L.; PONTES, A. L. S.; LÚCIO, A. S. S. C.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MADRUGA, M. S.; SOUZA, E. L. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, n. 2, 168–178, 2015.

HARRIS, L. J.; FARBER, J. N.; BEUCHAT, L. R.; PARISH, M. E.; SUSLOW, T. V.; GARRETT, E. H.; BUSTA, F. F. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 78-141, 2003.

HAYASHI, R. Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development, Engineering and Food. (W. E. L. Spiess and H. Schubert, eds.). London: Elsevier Applied Science, 1989. v. 2, p. 815.

HEINZ, V.; BUCKOW, R. Food preservation by high pressure. **Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit**, v. 5, n. 1, p. 73-81, 2010.

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

HU, W.; ZHOU, L.; XU, Z.; ZHANG, Y.; LIAO, X. Enzyme inactivation in food processing using high pressure carbon dioxide technology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 145-161. 2013.

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

HURTADO, A.; PICOUET, P.; JOFRÉ, A.; GUÀRDIA, M. D.; ROS, J. M.; BAÑÓN, S. Application of high pressure processing for obtaining “fresh-like” fruit smoothies. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 12, p. 2470–2482, 2015.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 1-25, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS – IBRAF. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. São Paulo: IBRAF, 2011. Disponível em: Acesso em 25 jan. 2018.

JAHURUL, M. H. A.; ZAIDUL, I. S. M.; GHAFOR, K.; AL-JUHAIMI, F. Y.; NYAM, K.; NORULAINI, N. A. N.; SAHENA, F.; MOHD OMAR, A. K. Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. **Food Chemistry**, v. 183, n. 15, p. 173-180, 2015.

JASSON, V.; UYTENDAELE, M.; RAJKOVIC, A.; DEBEVERE, J. Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 241-249, 2007.

JUNEJA, V. K.; NOVAK, J. S. Adaptation of foodborne pathogens to stress from exposure to physical intervention strategies. In: YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. (Eds.). **Microbial stress adaptation and food safety**, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2003. p. 31-54.

KAHRAMAN, O.; LEE, H.; ZHANG, W.; FENG, H. Manothermosonication (MTS) treatment of apple-carrot juice blend for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, n. 1, p. 820-828, 2017.

KARAMAN, K.; SAGDIC, O.; YILMAZ, M. T. Multiple response surface optimization for effects of processing parameters on physicochemical and bioactive properties of apple juice inoculated with *Zygosaccharomyces rouxii* and *Zygosaccharomyces bailii*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, n. 1, p. 258-272, 2016.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; TREICHEL, M.; FILTER, C. F. **Anuário brasileiro de fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2017, 88 p.

KONGKACHUICHAI, R.; CHAROENSIRI, R.; YAKOH, K.; KRINGKASEMSEE, A.; INSUNG, P. Nutrients value and antioxidant content of indigenous vegetables from Southern Thailand. **Food Chemistry**, v. 173, n. 15, p. 836-6, 2015.

KUJUR, A.; KIRAN, S.; DUBEY, N. K.; PRAKASH, B. Microencapsulation of *Gaultheria procumbens* essential oil using chitosan-cinnamic acid microgel: Improvement of

antimicrobial activity, stability and mode of action. **LWT-Food Science and Technology**, v. 86, n. 1, p. 132-138, 2017.

KUMAR, P.; MISHRA, S.; MALIK, A.; SATYA, S. Efficacy of *Mentha × piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L. **Industrial Crops and Products**, v. 39, n. 1, p. 106-112, 2012.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n.4, p. 1283-1287, 2006.

LEE, J.; KIM, S.; KANG, D. Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n.1, p. 83-88, 2015.

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

LEITE, C. J. B.; SOUSA, J. P.; MEDEIROS, J. A. C.; CONCEIÇÃO, M. L.; FALCÃO SILVA, V. S.; SOUZA, E. L. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Enteritidis by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. essential oil in pineapple juice. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 1, p. 213–219, 2016.

LIMA FILHO, T.; MINIM, V. P. R.; SILVA, R. C. S. N.; DELLA LUCIA, S. M.; MINIM, L. A. Methodology for determination of two new sensory thresholds: Compromised acceptance threshold and rejection threshold. **Food Research International**, v. 76, n. 3, p. 561-566, 2015.

LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, p. A18–A25, 2013.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; APARNATHI, K. D.; PRAJAPATI, J. B. Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885-901, 2016.

MANSO, S.; BECERRIL, R.; NERÍN, C.; GÓMEZ-LUS, R. Influence of pH and temperature variations on vapor phase action of an antifungal food packaging against five mold strains. **Food Control**, v. 47, n. 1, p. 20–26, 2015.

MATÉ, J.; PERIAGO, P. M.; PALOP, A. When nanoemulsified, D-limonene reduces *Listeria monocytogenes* heat resistance about one hundred times. **Food Control**, v. 59, n. 1, p. 824-828, 2016.

MATTIETTO, R. A.; LOPES, A. S.; MENEZES, H. C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 156-164, 2010.

MATTIOLI, M. C.; PICKERING, A. J.; GILSDORF, R. J.; DAVIS, J.; BOEHM, A. B. Hands water as vectors of diarrheal pathogens in Bagamoyo Tanzania. **Environmental Science & Technology**, v 47, n. 1, p. 355-363, 2013.

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 1, p. 1719-1729, 2012.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

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

MOHÁCSI-FARKAS, C.; KISKÓ, G.; MÉSZÁROS, L.; FARKAS, J. Pasteurization of tomato juice by high hydrostatic pressure treatment or by its combination with essential oils. **Acta Alimentaria**, v. 31, n.3, p. 243-252, 2002.

MOSQUEDA-MELGAR, J.; RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MARTÍN-BELLOSO, O. Non-thermal pasteurization of fruit juices by combining high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n.3, p. 328–340, 2008a.

MOSQUEDA-MELGAR, J.; RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MARTÍN-BELLOSO, O. 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**, v. 25, n.3, p.479-491, 2008b.

MOSQUETA-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, n. 2, p. 205-214, 2012.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; LOPES, F. F.; KALAKI, R.; MILAN, P. World consumption of fruit juices, nectars, and still drinks. In: NEVES, M.F., TROMBIN, V.G. (Eds.). **The orange juice business: A Brazilian perspective**. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2011. p. 119–119.

NGADI, M. Microbial decontamination of food by pulsed electric fields (PEFs). DEMIRCI, A.; NGADI, M. O. (Eds.). **Microbial Decontamination in the Food Industry: Novel Methods Application**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. p. 407–449, 2012.

NGUYEN, H. T. T.; CORRY, J. E. L.; MILES, C. A. Heat resistance and mechanism of heat inactivation in thermophilic campylobacters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 908-913, 2006.

PAGÁN, E.; BERDEJO, D.; ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Antimicrobial activity of suspensions and nanoemulsions of citral in combination with heat or pulsed electric fields. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 63-70, 2018.

PAGÁN, R.; JORDAN, S.; BENITO, A.; MACKEY, B. Enhanced acid sensitivity of pressure-damaged *Escherichia coli* O157:H7 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1983–1985, 2001.

PAL, M. Pulsed Electric Field Processing: An Emerging Technology for Food Preservation. **Journal of Experimental Food Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 2472–0542, 2017.

PENG, J.; TANG, J.; BARRETT, D. M.; SABLANI, S. S.; ANDERSON, N.; POWERS, J. R. Thermal pasteurization of ready-to-eat foods and vegetables: Critical factors for process design and effects on quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 2970-2995, 2017.

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

POIMENIDOU, S. A.; BIKOULI, V. C.; GARDELI, C.; MITSI, C.; TARANTILIS, P. A.; NYCHAS, G.; SKANDAMIS, P. N. Effect of single or combined chemical and natural antimicrobial interventions on *Escherichia coli* O157:H7, total microbiota and color of packaged spinach and lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, n. 2, p. 6-18, 2016.

PRAKASH, B.; KEDIA, A.; MISHRA, P. K.; DUBEY, N. K. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. **Food Control**, v. 47, n.1, p. 381-391, 2015.

PRAKASH, B.; KUJUR, A.; YADAV, A.; KUMAR, A.; SINGH, P. P.; DUBEY, N. K. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, n. 1, p. 1-11, 2018.

RAJKOVIC, A.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1, p. S29-S42, 2010.

RAMACHANDRAN, P.; NAGARAJAN, S. Quality characteristics, nutraceutical profile, and storage stability of aloe gel-papaya functional beverage blend. **International Journal of Food Science**, 2014. <<https://doi-org.ez15.periodicos.capes.gov.br/10.1155/2014/847013>>

RASGOTI, N. K. Application of high-intensity pulsed electrical fields in food processing. **Food Reviews International**, v. 19, n. 3, p. 229-251, 2003.

RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; BALASUBRAMANIAM, V. M.; NIRANJAN, K.; KNORR, D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 69-112, 2007.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; MOSQUEDA-MELGAR, J.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 157–80, 2009.

RIAHI, L.; ELFERCHICHI, M.; GHAZGHAZI, H.; JEBALI, J.; ZIADI, S.; AOADHI, C.; CHOGRANI, H.; ZAOUALI, Y.; ZOGHLAMI, N.; MLIKI, A. Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. 1, p. 883–889, 2013.

ROOBAB, U.; AADIL, R. M.; MADNI, G. M.; BEKHIT, A. E. The impact of nonthermal technologies on the microbiological quality of Juices: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 437-457, 2018.

ROOHINEJAD, S.; KOUBAA, M.; SANT'ANA, A. S.; GREINER, R. Mechanisms of microbial inactivation by emerging technologies. In: BARBA, F. J.; SANT'ANA, A. S.; ORLIEN, V.; KOUBAA, M. (Eds.). **Innovative technologies for food preservation: Inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms**, Elsevier: Academic Press, p. 111–132, 2018.

RUPASINGHE, H. P. V.; YU, L. J. Emerging preservation methods for fruit juices and beverages. In: El-Samragy Y (Ed.). **Food additive**, InTech. p. 65–82, 2012.

SALDAÑA, G.; PUÉRTOLAS, E.; CONDÓN, S.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 290-298, 2010.

SALVIA-TRUJILLO, L.; SUN, Q.; UM, B. H.; PARK, Y.; McCLEMENTS, D. J. In vitro and in vivo study of fucoxanthin bioavailability from nanoemulsion-based delivery systems: Impact of lipid carrier type. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n.1, p. 293-304, 2015.

SAN MARTIN, M. F.; BARBOSA-CANOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 6, p. 627-645, 2002.

SANTHIRASEGARAM, V.; RAZALI, Z.; SOMASUNDRAM, C. Chapter 12 – Safety improvement of fruit juices by novel thermal and nonthermal processing. **Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods**, p. 209- 223, 2016.

SANTOS, M. F. G.; MAMEDE, R. V. S.; RUFINO, M. S. M. R.; BRITO, E. S.; ALVES, R. E. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. **Antioxidants**, v. 4, n. 3, p. 591-602, 2015.

SCHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, v. 77, p. 279–285, 2006.

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

SEVERINO, R.; VU, K. D.; DONSI, F.; SALMIERI, S.; FERRARI, G.; LACROIX, M. Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, n. 17, p. 82-88, 2014.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Qualidade de suco de laranja in natura. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 461-466, 2012.

SILVIANO, R.; SILVA, G.; SANTOS, O. V. Qualidade nutricional e parâmetros morfológicos do fruto cajá (*Spondias mombin* L.). **Desafios**, v. 4, n. 2, p. 03-11, 2017.

SIMFORIAN, E.; NONGA, H. E.; NDABIKUNZE, B. K. Assessment of microbiological quality of raw fruit juice vended in Dares Salaam city Tanzania. **Food Control**, v. 57, n. 1, p. 302-307, 2015.

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A. M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemical Education**, v. 8, n. 3, p. 322-328, 2015.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; WALASEK, M. Preparative separation of menthol and pulegone from peppermint oil (*Mentha piperita* L.) by high-performance counter-current chromatography. **Phytochemistry Letters**, v. 10, n. 1, p. xciv-xcviii, 2014.

SMAOUI, S.; HSOUNA, A. B.; LAHMAR, A.; ENNOURI, K.; MTIBAA-CHAKCHOUK, A.; SELLEM, I.; NAJAH, S.; BOUAZIZ, M.; MELLOULI, L. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. **Meat Science**, v. 117, n. 10, p. 196-205, 2016.

SOMOLINOS, M.; GARCÍA, D.; CONDÓN, S.; MACKEY, B.; PAGÁN, R. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 6, p. 1928-1939, 2010.

SOUSA GUEDES, J. P. S.; MEDEIROS, J. A. C.; SILVA, R. S. S.; SOUSA, J. M. B.; CONCEIÇÃO, M. L.; SOUZA, E. L. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. **International journal of food microbiology**, v. 238, n. 1, p. 183-192, 2016.

SOUZA, E. L. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, n. 1, p. 2-12, 2016.

SOUZA, E. L.; ALMEIDA, E. T. C.; SOUSA GUEDES, J. P. The potential of the incorporation of essential oils and their individual constituents to improve microbial safety in

- juices: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 15, n. 4, p. 753-772, 2016.
- STONE, H.; BLEIBAUM, R. N.; THOMAS, H. A. **Sensory evaluation practices**. 4 ed. New York: Academic Press, 2012. 446 p.
- 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.
- TAUSCHER, B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 200, n. 1, p. 3-13, 1995.
- THARANATHAN, R. N.; YASHODA, H. M.; PRABHA, T. N. Mango (*Mangifera indica* L.), “The king of fruits” – A review. **Food Reviews International**, v. 22, n. 2, p. 95-123, 2006.
- TONIOLO, R.; PIZZARIELLO, A.; SUSMEL, S.; DOSSI, N.; BONTEMPELLI, G. A sensor on electrodes supported on ion-exchange membranes for the flow-injection monitoring of sulfur dioxide in wines and grape juices. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1809–15, 2010.
- TREICHEL, M.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; BELING, R. R. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2016, 88 p.
- TRIBST, A. A. L.; FRANCHI, M. A.; MASSAGUER, P. R.; CRISTIANINI, M. Quality of mango nectar processed by high-pressure homogenization with optimized heat treatment. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 106–10, 2011.
- TYAGI, A. K.; GOTTARDI, D.; MALIK, A.; GUERZONI, M. E. Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. **Food Chemistry**, v. 137, n. 15, p. 108–114, 2013.
- TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v. 22, n. 11, p. 1707–1714, 2011.
- U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - USFDA. **Guidance for industry: juice HACCP hazards and controls guidance**. 1st ed. 2004. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>> Acesso dia 25 de ago. de 2017.
- U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - USFDA. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juices; final rule. **Federal Register**, v. 66, n. 1, p. 6138–6202, 2001.
- VALERIANO, C.; OLIVEIRA, T. L. C.; CARVALHO, S. M.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 673-677, 2012.

- VEGARA, S.; MARTÍ, N.; MENA, P.; SAURA, D.; VALERO, M. Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 592-596, 2013.
- VIDAL, N. F.; XIMENES, L. J. F. Comportamento recente da fruticultura nordestina: área, valor da produção e comercialização. **Caderno setorial ETENE**, v. 1, n. 2, p. 18-26, 2016.
- VOJDANI, J. D.; BEUCHAT, L. R.; TAUXE, R. V. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 2, p. 356-364, 2008.
- VOON, C. H.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34–55, 2012.
- WALKER, M.; PHILLIPS, C. A. The effect of preservatives on *Alicyclobaillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. **Food Control**, v. 19, n. 10, p. 974–981, 2008.
- WHITNEY, B. M.; WILLIAMS, R. C.; EIFERT, J.; MARCY, J. High-pressure resistance variation of *Escherichia coli* O157:H7 strains and *Salmonella* serovars in tryptic soy broth, distilled water, and fruit juice. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2078-2083, 2007.
- WOUTERS, P. C.; ALVAREZ, I.; RASO, J. Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 3-4, p. 112-121, 2001.
- WUYTACK, E. Y.; PHUONG, L.D.; AERTSEN, A.; REYNS, K.M.; MARQUENIE, D.; KETELAERE, B.; MASSCHALCK, B.; OPSTAL, I.; DIELS, A. M.; MICHIELS, C. W. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 1, p. 31-37, 2003.
- YOUSEF, A. E.; COURTNEY, P. D. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. YOUSEF, A. E.; JUNEJA, V. K. (Eds.). **Microbial stress adaptation and food safety**, CRC Press, Boca Raton, Florida, 2003. p. 31-54.
- ZHANG, S. J.; ZHANG, M.; FANG, Z. X.; LIU, Y. P. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, n. 1, p. 316-322, 2017.
- ZINOVIADOU, K. G.; GALANAKIS, C. M.; MRNCIC, M.; GRIMI, N.; BOUSSETTA, N.; MOTA, M. J.; SARAIVA, J. A.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; BARBA, F. J. Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. **Food Research International**, v. 77, n. 4, p. 743-752, 2015.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

ARTIGO 1: Sensorially accepted doses of *Mentha piperita* L. essential oil used in combination with mild heat to control *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis PT4 in fruit juices

(Artigo submetido em Periódico Qualis A1; Fator de Impacto 3,759)

ARTIGO 2: Nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil in combination with heat and emerging technologies as an alternative to ensure microbial safety in tropical fruit juices

(Artigo submetido em Periódico Qualis A1; Fator de Impacto 2,573)

PATENTE: Combinado de óleo essencial de *Mentha piperita* L. e calor moderado para inibição de patógenos em sucos de fruta.

(Depositada; Número do Processo: BR 10 2018 010250 8)

4.1 ARTIGO 1: Sensorially accepted doses of *Mentha piperita* L. essential oil used in combination with mild heat to control *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis PT4 in fruit juices

(Artigo submetido em Periódico Qualis A1; Fator de Impacto 3,759)

Sensorially accepted doses of *Mentha piperita* L. essential oil used in combination with mild heat to control *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis PT4 in fruit juices

Running title: Mint essential oil and heating to preserve juices

Abstract

This study assessed the compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT) of *Mentha piperita* L. essential oil (MPEO) in cajá, guava and mango juices. The efficacy of MPEO doses below the RT in cajá, guava and mango juices were evaluated as a single agent or in a combined treatment with mild heat (54 °C; 8, 10 or 12 min) to cause ≥ 5 -log₁₀ reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in these juices. The effects of MPEO concentrations below the RT in combination with mild temperature (54 °C; 12 min) on some physicochemical parameters, namely the °Brix, pH and titratable acidity, of juices were assessed. GC/MS analysis of MPEO showed menthol (40.41 %) and isomenthone (19.78 %) as the majority constituents. The minimum inhibitory concentration of MPEO against both *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 was 5.0 µL/mL. The CAT of MPEO was 0.30 µL/mL in cajá juice, 0.31 µL/mL in guava juice and 0.32 µL/mL in mango juice. The RT of MPEO was 1.36 µL/mL in cajá juice and 1.34 µL/mL in guava and mango juice. Reductions of ≥ 5 log₁₀ cycles in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in tested fruit juices required MPEO doses close or higher (≥ 1.25 µL/mL) than that previously determined as the RT. The combined use of MPEO concentrations below the RT (0.16, 0.31 or 0.63 µL/mL) and mild heat treatment (54 °C) caused ≥ 5 -log₁₀ reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá, guava and mango juice. The time to achieve the 5- log₁₀ cycles reduction of the initial population of pathogens decreased when the MPEO concentration used in combination with the mild heat increased. The MPEO combined with mild temperature did not change the monitored physicochemical parameters in juices. These findings indicate the use of sensorially accepted low doses of MPEO in combination with mild heat as a feasible preservation technology to ensure the safety of tropical fruit juices.

Keywords: *Mentha* spp.; sensory threshold; mild heat treatment; combined process; bacterial inactivation; tropical fruit juices.

1. Introduction

The demand for fruit juices has increased in recent years because the consumer awareness about the relationship between a healthy diet and diseases prevention (Slavin and Lloyd, 2012). Fresh fruit juices are rich sources of vitamins, minerals and antioxidant compounds (Singh et al., 2015; Slavin and Lloyd, 2012).

Despite the inherent acidity of raw fruit juices, which is considered an intrinsic factor to control contaminant bacteria, outbreaks associated with the unpasteurized juices have challenged the conviction that high acid fruit juices do not harbor pathogens (Keller and Miller, 2006). *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. have been cited as pathogens frequently involved in fruit juices outbreak worldwide (CDC, 2016; EFSA 2015; Vojdani et al., 2008). *E. coli* O157:H7 has been recovered from different juices, such as carrot juice and apple cider (Kahraman et al., 2017; Sharma et al., 2011). Particularly, several outbreaks involving unpasteurized orange juice contaminated with *Salmonella enterica* Serovars have been reported (CDC, 1999; Harris et al., 2003; Lee et al., 2015).

To ensure the safety of fruit juices, the United States Food and Drug Administration (USFDA) regulation has issued a final rule for Juices Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) requiring a 5 log₁₀-reduction (99.999% of the initial population) in survival counts of pathogens of concern (USFDA 2001). The safety in fruit juices is generally achieved through using high-temperature (72 to 82 °C) during short-time (0.3 to 15 seconds) (USFDA, 2004) or by addition of preservatives (e.g., sodium benzoate and potassium sorbate) (Walker and Phillips, 2008). The application of high-temperatures results in negative effects on the nutritional (e.g., loss of vitamins), physicochemical (e.g., viscosity and color) and flavor characteristics of juices (Patrignani et al., 2009; Santhirasegaram et al., 2013). Additionally, there has been an increased concern regarding the use of synthetic preservatives in juices because most consumers consider them unnatural and unhealthy products (Bearth et al., 2014; Souza et al., 2016).

The essential oils obtained from *Mentha* species are widely used as food flavoring agents (Tyagi and Malik, 2011). Generally Recognized as Safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (Regulation number of the U.S. Code of Federal Regulations 8006-90-4), *Mentha piperita* L. essential oil (MPEO) is active against food-related microorganisms, including *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* (Djenane et al., 2012; Tyagi et al., 2013; Sousa Guedes et al., 2016). However, the strong flavor and taste of MPEO could be a limiting factor

for its use as antimicrobial preservative in juices if the active doses against juice-related bacteria achieve the sensory rejection threshold (Tyagi et al., 2013).

The combined use of essential oils (EOs) with low-intensity thermal treatments has been proposed as an alternative to preserve juices (Calo et al., 2015; Espina et al., 2012). Because EOs may act in synergism with mild thermal treatments, the required bacterial inactivation level could be achieved by using low doses of EOs (Ait-Ouazzou et al., 2013; Cherrat et al., 2014; Espina et al., 2012). Compromised acceptance threshold (CAT), which indicates the transition point between sensory acceptance and rejection, has been used as additional approach to the rejection threshold (RT) determination to direct investigations on consumers' acceptance. Specifically, the CAT indicates the intensity of the stimulus in which the acceptance of a product becomes significantly altered (Lima Filho et al., 2015). No previous studies have assessed if MPEO doses sensorially accepted in juices are effective, when used alone or in combination with mild thermal intensity treatments, to cause inactivation of pathogens in these products.

Considering these aspects, the present study was performed i) to determine the CAT and RT of MPEO in tropical juices (cajá, guava and mango juices); ii) to assess the efficacy of MPEO at concentration below the determined RT when used as a single agent or in a combined treatment with mild heat treatment to cause ≥ 5 -log₁₀ reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in these juices; and iii) to verify if MPEO concentrations below the RT in combination with mild temperature affects the physicochemical quality parameters of the studied juices.

2. Materials and methods

2.1. Essential oil

The MPEO (batch 187; density at 20 °C, 0.900; refractive index at 20 °C, 1.460; extracted through steam distillation) was purchased from Ferquima Ind. Com. Ltd. (São Paulo, Brazil). The MPEO emulsions were prepared in sterilized Brain Heart Infusion broth (BHIB; Himedia, India) at a range of concentrations (0.312 - 20 µL/mL) using Tween 80 (1%, v/v; Sigma–Aldrich, USA) as emulsifier (Leite et al., 2016). At the highest assayed concentration (1%, v/v), Tween 80 presented no inhibitory effect against the assayed bacterial strains.

2.2. Microorganisms and growth conditions

Escherichia coli O157:H7 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis PT4 strains isolated from foods involved in outbreaks (Reference Collection of epidemic *Salmonella* strains of Central Laboratory of the Parana State, Brazil) were used as test strains in the present study. The stock cultures were maintained in cryovials with BHIB containing glycerol (15 g/100 mL) at -80 °C. The cultures of each strain were obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) from overnight cultures grown in Brain Heart Infusion agar (BHIA; Himedia, India) at 37 °C. After that, each strain was grown in BHIB at 37 °C for 18 h to reach stationary growth phase, harvested through centrifugation (4500 g x 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and re-suspended in BHIB to obtain standard cell suspensions. The optical density (OD) reading at 625 nm (OD₆₂₅) of these suspensions was 0.09 and provided viable counts of approximately 8 log₁₀ colony forming units per milliliter (CFU/mL) for both strains (Leite et al., 2016). The final inoculum was prepared in BHIB (1:10) to obtain a work-bacterial suspension of 7 log₁₀ CFU/mL to provide a high number of viable cells in experiments to measure the required ≥ 5 -log₁₀ reduction in juices by USFDA regulation (USFDA, 2001).

2.3. Preparation of fruit juices

The cajá (*Spondias mombim* L.), guava (*Psidium guajava* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) fruits were purchased from a local wholesale distributor (João Pessoa, Brazil). The fruits were selected for similar shape and uniform color, with absence of mechanical damages and visible signs of infection. The °Brix ≥ 8.0 , ≥ 6.0 and ≥ 10 were considered the optimal maturity stage for cajá, guava and mango fruits, respectively (Brazilian Legislation, 2003). The fruits were surface disinfected through immersion in a sodium hypochlorite solution (150 ppm, pH 7.2 adjusted using 1 M NaOH) for 5 min, washed with sterile distilled water and dried for 30 min in a biosafety cabinet. Afterwards, the fruits were aseptically peeled, cut into small pieces and crushed using a domestic blender. The fruit pulps were stored in 100 g polypropylene bags, sealed and stored at -18 °C. When required for assays, the fruit juices were prepared by mixing 100 g of the fruit pulp with distilled water (1:1 ratio) using a domestic blender (for 3 min). The obtained juices were each centrifuged (12,500 g x 15 min, 4 °C) to separate the pulp from the remaining liquid. The supernatants were sterilized by autoclaving (121 °C, 1.1 atm, for 15 min) and used for subsequent assays (Leite et al., 2016).

The non-inoculated fruit juice samples used in the sensory analysis were prepared 24 h before the test, incorporated of MPEO at the desired final concentration and submitted to microbiological analysis to determine the compliance of microbiological standards (Brazilian Legislation, 2001). For determination of physicochemical parameters, the juice samples not submitted to autoclaving were used. Previous experiments showed that the monitored physicochemical parameters in tested fruit juices did not change after autoclaving (Sousa Guedes et al., 2016).

2.4. Identification of MPEO constituents

The constituents of MPEO were identified through gas chromatography coupled to mass spectrometry (CGMS-QP2010 Ultra Shimadzu, Kyoto, Japan). Analysis through GC–MS was performed under the following conditions: a RTX-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm x 0.25 μm); 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 (%) (Guerra et al., 2015).

2.5. Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of MPEO

The MIC of MPEO was determined using a microdilution in broth assay (CLSI, 2015). Approximately 50 μL of each MPEO emulsions (0.312 - 20 μL/mL) was dispensed into each well of a 96-well microplate. Subsequently, 50 μL aliquots of bacterial suspension were added to each well (final viable counts 6 log₁₀ CFU/mL). Each microplate included positive (inoculated) and negative (non-inoculated) control samples. The microplate was loosely wrapped with cling wrap to prevent bacterial dehydration and MPEO volatilization, and incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was confirmed as the lowest MPEO concentration capable of inhibiting visible bacterial growth (Sousa Guedes et al., 2016).

2.6. Determination of MPEO sensory thresholds in fruit juices: compromised acceptance threshold (CAT) and rejection threshold (RT)

The CAT and RT of MPEO in fruit juices were assessed following a previously described procedure (Lima Filho et al., 2015). The sensory analyses were performed after

approval from a Committee on Ethical Research Involving Humans Beings (Federal University of Paraíba, protocol 1.125.993/2015). A total of 50 untrained panelists (17 to 60 years old) that described consumption of fruit juices at least twice a week were pre-selected. The sensory tests comprised five sessions of acceptance tests (Stone et al., 2012) and were performed in individual booths under controlled temperature and light. In each session, the control sample (fruit juice without MPEO) and a stimulus sample (fruit juice with MPEO) were served simultaneously to the panelists using a blind random sequence. The panelists were asked to compare the samples and to attribute a score regarding their acceptance for each sample. For this, panelists were asked to taste the samples from left to right and describe their judgment using a nine-point hedonic scale (ranging from 1 = “extremely disliked” to 9 = “extremely liked”). After each session, panelists were advised to rinse their mouth with potable water and an interval of 5 min was observed before offering a new pair of fruit juice samples.

2.7. Evaluation of E. coli O157:H7 and S. Enteritidis PT4 inactivation in fruit juices by MPEO

The measurements of cell inactivation of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 caused by different MPEO concentrations (0.16, 0.31, 0.63, 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in cajá, guava and mango juice were assessed over 24 h of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C; proper storage temperature of juices). Initially, the tested bacterial suspensions were inoculated into fruit juice samples containing MPEO to obtain final viable counts of $7 \log_{10}$ CFU/mL. The different systems were gently hand-shaken for 30 s and subsequently incubated under refrigeration. At intervals of 0 (just after homogenization), 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h of storage, an aliquot of 100 μL of each juice was serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL), and subsequently, 20 μL -aliquots of each dilution were inoculated onto BHI agar (HiMedia, India) using the microdrop technique (Herigstad et al., 2001). Inoculated control juices without MPEO were assayed similarly. The plates were incubated at 37 °C for 24 - 48 h. Plates inoculated with aliquots collected from juice samples containing MPEO were incubated for an additional 24 h at an adequate temperature compared with samples collected from control juice samples. The results were expressed as \log_{10} CFU/mL. The detection limit was $2 \log_{10}$ CFU/mL for all experiments and strains tested.

2.8. Evaluation of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 inactivation in fruit juices by combined use of MPEO and mild heat treatment

The measurements of cell inactivation of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 caused by MPEO (0.16, 0.31, 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in combination with mild heat treatment (54 °C) after 8, 10 or 12 minutes of exposure was assessed as previously described (Espina et al., 2012). The exposure time intervals and temperature were selected based on results of previous studies using combination of EOs and mild heat treatment to preserve juices (Espina et al., 2011; Espina et al., 2012). Aliquots of 135 mL of fruit juice containing MPEO at different concentrations were distributed in 200 mL flasks and placed in a shaking bath thermostated at 54 °C. Once the core point of each fruit juice sample reached 54 °C, an aliquot of the bacterial suspension was added to the flasks to reach a final cell population of approximately $7 \log_{10}$ CFU/mL. After 8, 10 or 12 min at 54 °C, an aliquot of 100 μL of each fruit juice sample was serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and, subsequently, 20 μL -aliquots of each dilution were inoculated onto BHI agar (HiMedia, India) using the microdrop technique (Herigstad et al., 2001). The plates were incubated at 37 °C for 24 - 48 h and the results were expressed as \log_{10} CFU/mL. Systems comprising fruit juice without MPEO were performed similarly to evaluate the effects of the heat treatment alone on the bacterial survival at the different monitored time intervals. The detection limit was $2 \log_{10}$ CFU/mL for all experiments and strains tested.

2.9. Determination of physicochemical parameters of fruit juices

To assess if MPEO (0.16, 0.31, 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in combination with mild heat treatment (54 °C; 12 min) affects the physicochemical parameters of juices samples were analyzed for °Brix, pH and titratable acidity (TA) on time zero (baseline), just after the combined treatment and after 24 h of refrigeration storage (4 ± 0.5 °C) using standard procedure (AOAC, 2016). These parameters attempt the current Brazilian physicochemical standard to unsweetened fruit juices (Brazilian Legislation, 2003). The soluble solids content (°Brix) was determined using a digital refractometer (model HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil) (No. 932.12). The pH values were determined using a digital potentiometer (model Q400AS, Quimis, São Paulo, Brazil) (No. 981.12). The TA was determined using phenolphthalein as an indicator with 0.1 N NaOH, and the results were expressed in gram per 100 mL of citric acid equivalents (No. 942.15).

2.10. Statistical analysis

All assays were performed in three independent experiments. For MIC and MBC determination assays, the results are expressed as modal values because the MIC values were the same in all repetitions (Sousa Guedes et al., 2016). For the results of assays that measured bacterial survival (viable cell counts) and physicochemical parameters, statistical analyses were performed to determine significant differences ($p \leq 0.05$) using ANOVA followed by post-hoc Tukey's test or Student's t-test. The error bars in the figures indicate the mean \pm standard deviation from the data obtained from at least three independent experiments.

For sensory results, CAT determination for each session was performed using the paired t-test between hedonic score of the control sample (HSCS) and hedonic score of the stimulus sample (HSSS) (HSCS-HSSS). The obtained t values (Y1-axis) were graphically evaluated as a function of the MPEO concentrations assayed (X-axis). The point where acceptance begins to be compromised (i.e., the point where HSCS differs from HSSS) was represented as a dotted line in the graph (tabulated t value). To assess the RT of MPEO in the fruit juices, a second Y axis (Y2-axis) representing the average hedonic score of the HSSS was inserted in the graph. The transition point between sensory acceptance and rejection of the fruit juices was represented on the graph by a dashed line referring to the hedonic score 5 (hedonic term "indifferent") (Della Lucia et al., 2014). To determine the CAT and RT values, the regression models were adjusted to the points of the graph (Y1-axis points= CAT; Y2-axis points= RT). The quality of the generated models was determined from the significance of the regression coefficients and the coefficient of determination (r^2) ($SS_{\text{regression}}/SS_{\text{total}}$). From the model equation CAT was calculated considering where the calculated t value becomes equal to the standard t value ($p = 0.05$) ($Y1 = \text{tabulated } t \text{ value}$) and the RT was calculated considering the point where the average hedonic score for MPEO concentration becomes equal to "indifferent" in the hedonic scale ($Y2=5$) (Lima Filho et al., 2015). All statistical analyses were performed using the Sigma Stat 3.5 computer software (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

3. Results and discussion

3.1. Identification of constituents and MIC of MPEO

A total of forty-eight constituents was identified in the MPEO used in this study (Table 1). The constituents detected at the highest amounts were menthol (40.41%), followed by isomenthone (19.78%), neomenthol (8.68%), menthyl acetate (6.72%) and eucalyptol

(6.53%). Other constituents, such as caryophyllene (2.94%), limonene (2.59%), pulegone (1.40%), isopulegone (1.15%), β -pinene (1.15%) and α -pinene (1.1%), were detected in minor amounts. A variety of other constituents was detected in amounts lower than 1%. Previous studies also reported menthol (30.3 – 59.73%) and isomenthone (18.45 – 33%) as the majority constituents in with MPEO (Guerra et al., 2015; Smaoui et al., 2016; Tyagi et al., 2013).

The MIC of MPEO against both *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 was 5.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Previous studies have reported MIC of MPEO against *E. coli* O157:H7 varying from 0.63 – 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Djenane et al., 2012; Seo et al., 2015), but no study has reported the MIC of MPEO against *S. Enteritidis* PT4. The inhibitory effects of MPEO against foodborne pathogens has been primarily associated with the high concentration of menthol in its composition. The hydrophobic characteristic of menthol enables this compound to cause perturbation of the lipopolysaccharide barrier in the bacterial membrane that changes the permeability and causes leakage of intracellular materials (Schelz et al., 2006). The occurrence of synergistic interactions among menthol and other constituents found in MPEO (e.g., caryophyllene and limonene) to achieve antibacterial effects has been also suggested (Ait-Ouazzou et al., 2012; Singh et al., 2015). Caryophyllene and eucalyptol are well-known antibacterial agents and their uptake through the cell membranes could be facilitated by the initial perturbation in these cell organelles caused by menthol (Dahham et al., 2015; Zengin and Baysal, 2014).

3.2. Determination of sensory thresholds of MPEO in fruit juices: CAT and RT

The range of MPEO concentrations used in assays of CAT and RT determination included 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 and 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. These values were selected because the stimulus intensity range must include the limit threshold (Lawless and Heymann, 2010). Previous studies have reported that MPEO dose of 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (1/2 MIC against the pathogens tested in this study) may negatively affect sensory characteristics of juices (Leite et al., 2016; Sousa Guedes et al., 2016).

The t values (Y1-axis) and the mean hedonic score (Y2-axis) as a function of MPEO concentration in the stimulus fruit juice samples (X-axis) are shown in the Fig. 1A-C. The obtained linear models showed significant regression coefficients ($p \leq 0.05$) and good fit to the experimental data ($r^2 \geq 0.9$) (Table 2). The calculated CAT values of MPEO ($Y1 = 2.009$ in Eq. 1, Table 2) were 0.30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in cajá juice, 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in guava juice and 0.32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in mango juice. The calculated RT values ($Y2 = 5$ in Eq. 2, Table 2) of MPEO were 1.36

$\mu\text{L}/\text{mL}$ in cajá juice and $1.34 \mu\text{L}/\text{mL}$ in guava and mango juices. MPEO at $0.16 \mu\text{L}/\text{mL}$ was considered acceptable by panelists in all fruit juices tested without compromising their acceptance. MPEO at concentrations $\geq 0.30 \mu\text{L}/\text{mL}$ and $\leq 1.30 \mu\text{L}/\text{mL}$ were also accepted but, although they were \geq CAT values meaning that would compromise acceptance, they were still accepted in all tested fruit juices.

Based on the sensory evaluation by panelists, the variation in the fruit juices acceptance profile as a function of the MPEO concentration was assessed by an adjustment of the regression model to the hedonic scores. The angular coefficient $-2.6276 (< 0)$ shows that as Y axis values decreased the X axis values increased. The increase of one fold in MPEO concentration (X) resulted in a reduction of approximately 2.6276 in the hedonic score (Y2) (Table 2). Therefore, the variation in MPEO concentration strongly affected the sensory acceptance of the fruit juices.

This is the first study focusing on the determination of MPEO sensory thresholds in juices. Generally, sensory tests (overall acceptance or preference tests) with EOs have been performed with concentrations that display strong antimicrobial efficacy in fruit juices; however, the subsequent analyses have shown that the effective antimicrobial doses affect negatively the taste and general acceptance of these products. Therefore, for a correct evaluation of EOs applicability in fruit juices, the determination of EOs sensory thresholds in the intended matrix could represent a first step to enable a more successfully experimental approach.

3.3. Evaluation of E. coli O157:H7 and S. Enteritidis PT4 inactivation in fruit juices by MPEO

The effects of MPEO concentrations below the RT ($0.16, 0.31, 0.63$ and $1.25 \mu\text{L}/\text{mL}$) on the survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá, guava and mango juices are presented in Figures 2-4. Fruit juices with MPEO consistently presented lower survival counts ($p \leq 0.05$) of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 over time when compared with juices without MPEO, with the exception of *S. Enteritidis* PT4 in mango (Fig. 4B) and guava (Fig. 3B) juices with $0.16 \mu\text{L}/\text{mL}$ of MPEO. In cajá juice without MPEO, both tested pathogens showed a decrease of approximately 1 \log_{10} cycle in survival counts after 24 h of refrigerated storage (Fig. 2A-B). The MPEO concentration of $0.16 \mu\text{L}/\text{mL}$ caused approximately 2- \log_{10} reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá juice after 24 h of refrigerated storage (Fig 2A-B). This same MPEO concentration

caused a reduction of 1.75 \log_{10} in survivors of *E. coli* O157:H7 in guava juice (Fig. 3A) and a reduction of 1.0 \log_{10} in survivors of this pathogen in mango juice (Fig. 4A). The MPEO concentration of 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$ caused a reduction in survival counts of both test pathogens by approximately 3 \log_{10} cycles in cajá juice (Fig. 2A-B), 2 \log_{10} cycles in guava juice (Fig. 3A-B) and 1 \log_{10} cycles in mango juice (Fig. 4A-B) after 24 h of refrigerated storage.

A reduction of approximately 4 \log_{10} was observed in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá juice with 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of MPEO after 24 h of refrigerated storage. In guava and mango juices MPEO concentration of 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ reduced approximately of 3 \log_{10} in survival counts of both pathogens after 24 h of refrigerated storage, with exception of *S. Enteritidis* PT4 counts in mango juice (reduction 1.27 \log_{10} cycles; Fig. 4B).

MPEO concentration of 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ caused a reduction $\geq 5\text{-}\log_{10}$ in survival counts of *E. coli* O157:H7 (Fig. 2A) and *S. Enteritidis* PT4 (Fig. 2B) in cajá juice after 24 h of refrigerated storage. Otherwise, in guava and mango juice this concentration of MPEO caused a reduction of $\geq 5\text{-}\log_{10}$ in survivors of *E. coli* O157:H7 (Fig. 3A; 4A) and of approximately 4 \log_{10} in survivors of *S. Enteritidis* PT4 (Fig. 3B; 4B) after 24 h of refrigerated storage.

The observed dose-dependent effects of MPEO on the survival counts of target pathogens is in accordance with previous results reported the effects of this EO against juice-related microorganism (Sousa Guedes et al., 2016; Tyagi et al., 2013). Considering the results in fruit juices, MPEO was more effective to reduce the survival counts of target pathogens in cajá juice, followed by guava juice and mango juice. Probably the highest acidity of cajá juice, compared to guava and mango juices (as observed in TA determination), enhanced the antibacterial effects of MPEO. The hydrophobicity of the EOs typically increases at low pH values, enabling these substances to dissolve more easily into the cell membrane lipids of the target bacteria (Schelz et al., 2006). A previous study also observed positive influence of low pH in the inhibitory effects of MPEO against pathogenic bacterial in fruit juices (Sousa Guedes et al., 2016).

Overall, despite the variation in survival counts reductions observed among the tested fruit juices or target pathogens, only the MPEO concentration of 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ caused a 5- \log_{10} reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in all tested juices, as recommended by the rule for inactivation of pathogens in fruit juices (USFDA, 2001). Considering the results of the sensory analysis previously described, the MPEO concentration required to achieve a 5- \log_{10} reduction of the initial population (i.e., 1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) is very close

to the RT value determined for MPEO in the three tested juices (i.e., 1.36 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in cajá juice and 1.34 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in guava and mango juices). Therefore, the MPEO concentration of 0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$, that did not compromise the juice acceptance ($< \text{CAT}$), as well as the concentrations of 0.31 and 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$, which despite of compromising the juice acceptance were still sensorially accepted, were included in assays of the combined use of MPEO with mild heat to inactivate *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá, guava and mango juices.

3.4. Evaluation of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 inactivation in fruit juices by combined use of MPEO and mild heat treatment

The combined use of mild heat (54 °C) and MPEO concentrations of 0.16, 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 8 min caused a 5- \log_{10} reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá juice (Fig. 5A-B). The use of the same mild heat treatment for 8 min alone in the same juice caused the reduction of 3 \log_{10} in survivors of *E. coli* O157:H7 and 2 \log_{10} cycles in survivors of *S. Enteritidis* PT4. MPEO concentrations of 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in combination with mild heat treatment for 8 min caused a 5- \log_{10} reduction in survival counts of both pathogens in guava juice (Fig. 5C-D). In the same juice, the combined use of 0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of MPEO with mild heat treatment for 8 min caused a 5- \log_{10} and 4- \log_{10} reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 (Fig. 5D) and *S. Enteritidis* PT4 (Fig. 5C), respectively. In mango juice, only the highest tested concentration of MPEO (0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and mild heat for 8 min caused a 5- \log_{10} reduction in survival counts of both pathogens (Fig. 5E-F). MPEO concentration of 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in combination with mild heat for 8 min caused a 5- \log_{10} and 4- \log_{10} reduction in survivors of *E. coli* O157:H7 (Fig. 5F) and *S. Enteritidis* PT4 (Fig. 5E), respectively.

A 2 min-increase (up to 10 min) in exposure time to the combined use of mild heat with the lowest tested MPEO concentration (0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$) caused 5 \log_{10} reduction in survival counts of *S. Enteritidis* PT4 (Fig. 5C) in guava juice and *E. coli* O157:H7 (Fig. 5F) in guava and mango juice. Similar inactivation levels in *S. Enteritidis* PT4 survival were achieved in mango juice treated with 0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of MPEO and mild heat for 12 min (Fig. 5E).

The comparison of the inactivation levels achieved by the use of mild heat for 8, 10 or 12 min alone with those caused by the tested combined treatment indicate a strong synergistic action of MPEO and mild heat treatments. Similar results were observed in previous studies with the use of different EOs in combination with mild heat (54 °C; 10 min) (Ait-Ouazzou et al., 2012; Espina et al., 2011; 2012). Researchers have suggested that the sublethal injuries in

bacterial cells, specifically by disturbing the outer and cytoplasmic membranes, caused by mild temperatures could facilitate the action of EOs on target cells (Espina et al., 2012).

The inactivation of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 by the combined treatment depended on the juice type, MPEO concentration and time of treatment. At the same MPEO concentration, different time intervals were needed to achieve 5- log₁₀ reduction in survival counts of target pathogens depending on the tested fruit juice type. Additionally, the time required to achieve the 5-log₁₀ reduction in survival counts decreased when the MPEO concentration used in combination with the mild heat increased. Similarly, an earlier study reported that the inactivation levels of *E. coli* O157:H7 in orange juice increased when amounts of *Citrus sinensis* L. essential oil used in combination with heat treatment increased or when the exposure time to the combined treatment increased (Espina et al., 2014).

Overall, all the MPEO concentrations tested in combination with mild heat that were effective to cause 5-log₁₀ reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá, guava and mango juices were below the RT in sensory analyses. Furthermore, the lowest MPEO concentration tested (0.16 µL/ mL) in combination with mild heat was below the CAT. These findings are noteworthy because sensory acceptance is a determining factor for successful application of certain innovative technologies to preserve foods (Rajkovic et al., 2010). The results obtained in the present study indicate the combined use of low doses of MPEO and mild heat to provide a balance between sensory acceptance and antimicrobial efficacy in fruit juices.

3.5. Determination of physicochemical parameters of fruit juices

No differences ($p > 0.05$) were observed among the values of the monitored physicochemical parameters in cajá, guava and mango juices treated with MPEO and mild temperature in combination (54 °C; 12 min) at time zero, just after the combined treatment and after 24 h of refrigerated storage (Table 3). The physicochemical parameters of all juice samples were within the Brazilian standards for unsweetened cajá (TA ≥ 0.50; °Brix ≥ 8.0), guava (TA ≥ 0.30; °Brix ≥ 6.0) and mango (TA ≥ 0.30; °Brix ≥ 10.0) juices (Brazilian Legislation, 2003). Previous studies also observed that the incorporation of EOs in different fruit juices did not change their physicochemical parameters during refrigerating storage (Leite et al., 2016; Sousa Guedes et al., 2016). No previous have reported if the use of MPEO and mild temperature in combination affects the physicochemical parameters in fruit juices. These results are interesting in a practical point of view because if changes in

physicochemical parameters occur, they might negatively affect nutritional composition or sensory characteristics of the juices (Souza et al., 2016).

4. Conclusion

The results of this study showed that the efficacy of MPEO when used as a single agent to cause $\geq 5 \log_{10}$ -reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* PT4 in cajá, guava and mango juices is generally achieved by concentrations close the RT, which could make these juices sensorially unacceptable by consumers. However, MPEO concentrations below the RT (0.16, 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) when used in combination with mild heat treatment (54 °C for 8, 10 or 12 min) were effective to cause $\geq 5 \log_{10}$ reduction in survival counts of target pathogens in cajá, guava and mango, despite the variation in survival counts reductions among juices and exposure times. Furthermore, MPEO in combination with mild heat did not affect physicochemical parameters, namely °Brix, pH and titratable acidity, in all tested fruit juices. This is the first study exploiting the efficacy of sensorially accepted concentrations of MPEO for application as a single agent or in combination with mild heat treatment. The findings of this study indicate the combined use of sensorially accepted low doses of MPEO and mild heat in combination as a feasible preservation technology to be used in tropical fruit juices.

Acknowledgments

The authors thank CNPq-Brazil; Grant Number 401100/2014-6) for financial support and scholarships awarded to R.J. de Carvalho, G.T de Souza, and J.M.B. de Sousa, and MINECO Project (No. AGL2015-69565-P) for financial support. Thank the Unity for Characterization and Analysis - Institute for Research in Drugs and Medicines (Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil) for the identification of the MPEO constituents.

References

- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2013. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157:H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. *Food Control*. 32, 159-167.
- Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, P. Conchello., P., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity

of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. Food Res. Int. 45, 313-319.

Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2016. Official Methods of Analysis of Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Method No. 932.12, Method No. 981.12, Method N. 942.15. 18th ed. AOAC International, Washington.

Bearth, A., Cousin, M., Siegrist, M., 2014. The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. Food Qual. Prefer. 38, 14-23.

Brazilian Legislation, 2001. Ministry of Health. National Health Surveillance Agency. Technical Regulation on the Microbiological Standards for Foods. RDC Resolution No. 12, 2 January 2001. (In Portuguese.). Published 2 January 2001. Available at http://portal.anvisa.gov.br/RDC_12_2001.pdf (Accessed October 10, 2017).

Brazilian Legislation, 2003. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Technical regulation for establishment of identity and general quality parameters of tropical juice, Normative Instruction number 12, 4 September 2003. (In Portuguese.). Published 4 September 2003. Available at <http://sistemasweb.agricultura.gov.br> (Accessed September, 14 2017).

Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. Food Control. 54, 111-119.

CDC, 2016. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Outbreak Online Database (FOOD). Available from: <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> Accessed 2017 Apr 5.

CDC, 1999. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice - United States and Canada, June 1999. Morb Mortal Wkly Rep. 48, 582-585.

Cherrat, L., Espina L., Bakkali, M., Pagán, R., Laglaoui, A., 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and evaluation of their bactericidal effect in combined processes. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 22, 221-229.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, CLSI Document M07-A10. tenth ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania.

- Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Iqbal, M.A., Ahamed, M.B.K., Ezzat, M.O., Majid, A.S.A., Majid, A.M.S.A., 2015. The Anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. 20, 11808-11829.
- Della Lucia, S.M., Minim, V.P.R., Silva, C.H.O., Minim, L.A., Cipriano, P.A., 2014. Use of relative risk test to evaluate the influence of the brand on beer acceptability. *Semin: Cien. Agrar.* 35, 2267–276.
- Djenane, D., Aider, M., Yanguela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés, P., 2012. Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Sci.* 92, 667-674.
- Espina L., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2014. Synergistic effect of orange essential oil or (+)-limonene with heat treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice at lower intensities while maintaining hedonic acceptability. *Food Bioprocess. Tech.* 7, 471–81.
- Espina, L., Somolinos, M., 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. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 9-16.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García-Gonzalo, D., Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity alone or in combined processes. *Food Control.* 22, 896-902.
- European Food Safety Authority, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J* 13, 1–165.
- Fardsanei, F., Dallal, M.M.S., Douraghi, M., Salehi, T.Z., Mahmoodi, M., Memariani, H., Nikkhahi, F., 2017. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microb. Pathog.* 107, 451-456.
- Food and Drug Administration (USFDA), 2004. Guidance for industry: juice HACCP hazards and controls guidance. 1st ed. Available from: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>. Accessed Jan 25, 2017
- Guerra, I.C.D., Oliveira, P.D.L., Pontes, A.L.S., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa Filho, J.M., Madruga, M.S., Souza, E.L., 2015. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha x villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold

infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 214, 168-178.

Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F., 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. In analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2, 78-141.

Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J., 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 44, 121–129.

Kahraman, O., Lee, H., Zhang, W., Feng, H., 2017. Manothermosonication (MTS) treatment of apple-carrot juice blend for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Ultrason. Sonochem.* 38, 820-828.

Keller, S.E., Miller, A.J., 2006. Microbiological safety of fresh citrus and apple juices. G.M. Sapers, J.R. Gorny, A.E. Yousef (Eds.), *Microbiology of Fruits and Vegetables*, CRC Press, Boca Raton, 211-230.

Lawless, H. T., Heymann, H., 2010. *Sensory evaluation of food: Principles and practices*. 2^a ed. New York: Springer, 596p.

Lee, J., Kim, S., Kang, D., 2015. Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. *LWT – Food Sci. Technol.* 62, 83-88.

Leite, C.J.B., Sousa, J.P., Medeiros, J.A.C., Conceição, M.L., Falcão-Silva, V.S., Souza, E.L., 2016. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. Essential oil in pineapple juice. *J. Food Prot.* 79, 213-219.

Lima Filho, T., Minim, V.P.R., Silva, R.C.S.N., Lucia, S.M.D., Minim, L.A., 2015.

Methodology for determination of two new sensory thresholds: Compromised acceptance threshold and rejection threshold. *Food Res. Int.* 76, 561-566.

Papadopoulos, T., Petridou, E., Zdragas, A., Mandilara, G., Nair, S., Peters, T., Chattaway, M., Pinna, E., Passiotou, M., Vatopoulos, A., 2016. Comparative study of all *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains isolated from food and food animals in Greece from 2008 to 2010 with clinical isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 741-746.

Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S.L.S., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E., 2009. Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 26-31.

- Rajkovic, A., Smigic, N., Devlieghere, F., 2010. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S29-S42.
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., Somasundram, C., 2013. Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrason. Sonochem.* 20, 1276 – 1282.
- Seo, H., Beuchat, L.R., Kim, H., Ryu, J., 2015. Development of an experimental apparatus and protocol for determining antimicrobial activities of gaseous plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 215, 95-100.
- Sharma, M., Luo, Y., Buchanan, R., 2011. Microbial safety of tropical and subtropical fruits, p. 288–314. In: E.M. Yahia (ed.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits, Vol. 1: Fundamental issues.* Woodhead Publishing, Cambridge.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia.* 77, 279-285.
- Singh, R., Shushni, M.A.M., Belkheir, A., 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arab. J. Chem.* 8, 322-328.
- Slavin, J.L., Lloyd, B., 2012. Health Benefits of Fruits and Vegetables. *Adv. Nutr.* 3, 506-516.
- Smaoui, S., Hsouna, A.B., Lahmar, A., Ennouri, K., Mtibaa-Chakchouk, A., Sellem, I., Najah, S., Bouaziz, M., Mellouli, L., 2016. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. *Meat Sci.* 117, 196-204.
- Sousa Guedes, J.P.S., Medeiros, J.A.C., Silva, R.S.S., Sousa, J.M.B., Conceição, M.L., Souza, E.L., 2016. The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 183-192.
- Souza, E.L., 2016. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 56, 1-12.
- Souza, E.L., Almeida, E.T.C., Sousa Guedes, J.P., 2016. The potential of the incorporation of essential oils and their individual constituents to improve microbial safety in juices: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 753-772.
- Stone, H., Bleibaum, R.N., Thomas, H.A., 2012. *Sensory Evaluation Practices.* (4th ed.) Academic Press, New York, 446.

- Tyagi, A.K., Gottardi, D., Malik, A., Guerzoni, M.E., 2013. Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through in vitro and in vivo (real fruit juices) assays. *Food Chem.* 137, 108–114.
- Tyagi, A.K., Malik, A., 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control* 22, 1707–1714.
- U.S. Food and Drug Administration (USFDA), 2001. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juices; final rule. *Fed. Regist.* 66, 6138–6202.
- Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V., 2008. Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *J. Food Prot.* 71, 356-364.
- Walker, M., Phillips, C.A., 2008. The effect of preservatives on *Alicyclobaillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. *Food Control.* 19, 974–981.
- Zengin, H., Baysal, A.H., 2014. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules.* 19, 17773-17798.
- Zheng, J., Pettengill, J., Strain, E., Allard, M.W., Ahmed, R., Zhao, S., Brown, E.W., 2014. Genetic diversity and evolution of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis strains with different phage types. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1490-1500.

Table 1. Constituents identified in the essential oil from *Mentha piperita* L. Results are expressed as a percentage (%) of the total area.

| Peak | Retention time | Constituent | % |
|------|----------------|------------------------------------|-------|
| 1 | 3.035 | 3-Hexanone | 0.02 |
| 2 | 3.126 | Cyclopentanol, 1-methyl- | 0.19 |
| 3 | 3.194 | 2-Hexanol | 0.06 |
| 4 | 3.870 | Cyclopentanol, 3-methyl- | 0.04 |
| 5 | 4.297 | Hexanol-n | 0.08 |
| 8 | 5.892 | α -pinene | 1.10 |
| 9 | 6.326 | (+/-)-Lavandulol, trifluoroacetate | 0.06 |
| 10 | 6.834 | 3-Hexen-2-one | 0.16 |
| 11 | 7.005 | Sabinene | 0.24 |
| 12 | 7.133 | β -Pinene | 1.15 |
| 13 | 7.482 | Myrcene | 0.12 |
| 14 | 7.616 | Hexanol-ethyl | 0.23 |
| 15 | 8.668 | <i>p</i> -Cymene | 0.08 |
| 16 | 8.827 | Limonene | 2.59 |
| 17 | 8.941 | Eucalyptol | 6.53 |
| 18 | 9.920 | β -Terpinene | 0.06 |
| 19 | 10.339 | 1-Octanol | 0.12 |
| 20 | 11.080 | Terpinolene | 0.09 |
| 21 | 11.513 | Linalool | 0.13 |
| 22 | 13.496 | Isopulegol | 1.15 |
| 23 | 13.972 | Isomenthone | 19.78 |
| 24 | 14.375 | Neomenthol | 8.68 |
| 25 | 14.893 | Menthol | 40.41 |
| 26 | 14.978 | 4-Terpineol | 0.24 |
| 27 | 15.213 | Neoisomenthol | 0.75 |
| 28 | 15.434 | α -Terpineol | 0.44 |
| 29 | 16.724 | <i>Trans</i> -Carveol | 0.03 |
| 30 | 17.628 | Pulegone | 1.40 |
| 31 | 17.827 | Carvone | 0.04 |
| 32 | 18.290 | Piperitone | 0.65 |
| 33 | 19.031 | Decyl alcohol | 0.25 |
| 34 | 19.181 | Menthyl acetate | 6.72 |
| 35 | 21.946 | Bicyclogermacrene | 0.09 |
| 36 | 23.667 | Copaene | 0.05 |
| 37 | 24.072 | β -Bourbonene | 0.23 |
| 38 | 24.366 | β -Elemene | 0.09 |
| 39 | 25.609 | Caryophyllene | 2.94 |
| 40 | 25.895 | 3-Eicosyne | 0.05 |
| 41 | 25.992 | β -Cubebene | 0.15 |

| | | | |
|-------|--------|---------------------------|--------|
| 42 | 26.645 | Isogermacrene D | 0.05 |
| 43 | 27.038 | (Z)- α -Bisabolene | 0.43 |
| 44 | 28.204 | Germacrene D | 0.12 |
| 45 | 28.919 | Isogermacrene D | 0.32 |
| 46 | 29.958 | Δ -Cadinene | 0.17 |
| 47 | 50.356 | Methyl linoleate | 0.92 |
| 48 | 50.568 | Methyl elaidate | 0.80 |
| Total | | | 100.00 |

Table 2. Adjusted models of CAT and RT determination of *Mentha piperita* L. essential oil in cajá, guava and mango juices, and their respective coefficients of determination.

| Juice | Model | r^2 |
|-------|------------------------|--------|
| Cajá | Y1 = 11.616x - 1.4702 | 0.9265 |
| | Y2 = -2.6276x + 8.5814 | 0.9108 |
| Guava | Y1 = 9.8167x - 0.9906 | 0.9544 |
| | Y2 = -2.3122x + 8.0998 | 0.9206 |
| Mango | Y1 = 10.652x - 1.4149 | 0.9498 |
| | Y2 = -2.3122x + 8.0998 | 0.9206 |

Y1 - calculated t values; Y2 - mean hedonic score; X - concentration of *Mentha piperita* L. essential oil; r^2 - coefficient of determination.

Table 3. Physicochemical parameters (average \pm standard deviation; n = 6) of cajá, guava and mango juices before and after the treatment with *Mentha piperita* L. essential oil (MPEO) in combination with mild heat treatment (54 °C; 12 min) and after 24 h of refrigerated storage (4 \pm 0.5 °C).

| Juices | MPEO (μ L/mL) | Physicochemical parameters (storage time interval) | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Total soluble solids ($^{\circ}$ Brix) | | | pH | | | Titratable acidity (g/100 g citric acid) | | |
| | | Time zero (baseline) | After combined treatment* | 24 h | Time zero | After combined treatment* | 24 h | Time zero | After combined treatment* | 24 h |
| Cajá | 0.63 | 8.00 \pm 0.11 ^{Aa} | 8.00 \pm 0.15 ^{Aa} | 8.03 \pm 0.09 ^{Aa} | 3.07 \pm 0.02 ^{Aa} | 3.05 \pm 0.03 ^{Aa} | 3.01 \pm 0.04 ^{Aa} | 0.97 \pm 0.07 ^{Aa} | 0.97 \pm 0.06 ^{Aa} | 1.06 \pm 0.06 ^{Aa} |
| | 0.31 | 8.01 \pm 0.17 ^{Aa} | 8.01 \pm 0.12 ^{Aa} | 8.07 \pm 0.13 ^{Aa} | 3.06 \pm 0.02 ^{Aa} | 3.02 \pm 0.05 ^{Aa} | 3.00 \pm 0.06 ^{Aa} | 0.97 \pm 0.01 ^{Aa} | 1.07 \pm 0.05 ^{Aa} | 1.06 \pm 0.03 ^{Aa} |
| | 0.16 | 8.02 \pm 0.13 ^{Aa} | 8.03 \pm 0.10 ^{Aa} | 8.07 \pm 0.08 ^{Aa} | 3.06 \pm 0.04 ^{Aa} | 3.08 \pm 0.09 ^{Aa} | 2.99 \pm 0.05 ^{Aa} | 0.97 \pm 0.02 ^{Aa} | 1.00 \pm 0.09 ^{Aa} | 1.02 \pm 0.03 ^{Aa} |
| | Control | 8.01 \pm 0.06 ^{Aa} | 8.02 \pm 0.08 ^{Aa} | 8.08 \pm 0.05 ^{Aa} | 3.09 \pm 0.03 ^{Aa} | 3.06 \pm 0.07 ^{Aa} | 2.97 \pm 0.04 ^{Aa} | 0.97 \pm 0.01 ^{Aa} | 0.97 \pm 0.08 ^{Aa} | 0.99 \pm 0.01 ^{Aa} |
| Guava | 0.63 | 8.95 \pm 0.09 ^{Aa} | 8.93 \pm 0.11 ^{Aa} | 8.74 \pm 0.11 ^{Aa} | 4.09 \pm 0.05 ^{Aa} | 4.08 \pm 0.06 ^{Aa} | 4.12 \pm 0.06 ^{Aa} | 0.37 \pm 0.08 ^{Aa} | 0.39 \pm 0.06 ^{Aa} | 0.40 \pm 0.04 ^{Aa} |
| | 0.31 | 8.96 \pm 0.13 ^{Aa} | 8.71 \pm 0.07 ^{Aa} | 8.78 \pm 0.06 ^{Aa} | 4.11 \pm 0.06 ^{Aa} | 4.19 \pm 0.03 ^{Aa} | 4.13 \pm 0.05 ^{Aa} | 0.38 \pm 0.03 ^{Aa} | 0.40 \pm 0.05 ^{Aa} | 0.39 \pm 0.06 ^{Aa} |
| | 0.16 | 8.97 \pm 0.06 ^{Aa} | 8.82 \pm 0.03 ^{Aa} | 8.78 \pm 0.14 ^{Aa} | 4.14 \pm 0.09 ^{Aa} | 4.19 \pm 0.03 ^{Aa} | 4.10 \pm 0.05 ^{Aa} | 0.38 \pm 0.02 ^{Aa} | 0.37 \pm 0.08 ^{Aa} | 0.39 \pm 0.02 ^{Aa} |
| | Control | 8.97 \pm 0.07 ^{Aa} | 8.80 \pm 0.13 ^{Aa} | 8.79 \pm 0.15 ^{Aa} | 4.11 \pm 0.05 ^{Aa} | 4.10 \pm 0.05 ^{Aa} | 4.08 \pm 0.06 ^{Aa} | 0.38 \pm 0.03 ^{Aa} | 0.39 \pm 0.09 ^{Aa} | 0.39 \pm 0.06 ^{Aa} |
| Mango | 0.63 | 11.90 \pm 0.10 ^{Aa} | 11.90 \pm 0.12 ^{Aa} | 12.00 \pm 0.07 ^{Aa} | 4.72 \pm 0.07 ^{Aa} | 4.69 \pm 0.06 ^{Aa} | 4.58 \pm 0.04 ^{Aa} | 0.33 \pm 0.02 ^{Aa} | 0.34 \pm 0.05 ^{Aa} | 0.31 \pm 0.03 ^{Aa} |
| | 0.31 | 11.91 \pm 0.07 ^{Aa} | 11.99 \pm 0.05 ^{Aa} | 12.01 \pm 0.03 ^{Aa} | 4.72 \pm 0.05 ^{Aa} | 4.60 \pm 0.08 ^{Aa} | 4.59 \pm 0.06 ^{Aa} | 0.33 \pm 0.01 ^{Aa} | 0.32 \pm 0.02 ^{Aa} | 0.30 \pm 0.06 ^{Aa} |
| | 0.16 | 11.91 \pm 0.08 ^{Aa} | 12.00 \pm 0.05 ^{Aa} | 12.02 \pm 0.08 ^{Aa} | 4.73 \pm 0.02 ^{Aa} | 4.64 \pm 0.03 ^{Aa} | 4.59 \pm 0.06 ^{Aa} | 0.33 \pm 0.02 ^{Aa} | 0.30 \pm 0.07 ^{Aa} | 0.31 \pm 0.02 ^{Aa} |
| | Control | 11.91 \pm 0.06 ^{Aa} | 12.03 \pm 0.09 ^{Aa} | 12.06 \pm 0.04 ^{Aa} | 4.74 \pm 0.03 ^{Aa} | 4.65 \pm 0.07 ^{Aa} | 4.55 \pm 0.04 ^{Aa} | 0.33 \pm 0.02 ^{Aa} | 0.32 \pm 0.05 ^{Aa} | 0.31 \pm 0.03 ^{Aa} |

Control (0 μ L/mL): fruit juice without MPEO.

Different superscript capital letters in the same row indicate significant difference ($p \leq 0.05$), based on Student t-test.

Different superscript small letters in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$), based on Tukey test.

*After combined treatment of MPEO with mild heat (54 °C; 12 min).

Figure captions

Figure 1. Calculated t values and mean hedonic scores in function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration for cajá (A), guava (B) and mango (C) juices. The black dashed line represents the tabulated t ($t_{tab} = 2.009$) and the black circle (○) the compromised acceptance threshold. The gray dashed line represents a mean hedonic score of 5 and the gray circle (○) the rejection threshold.

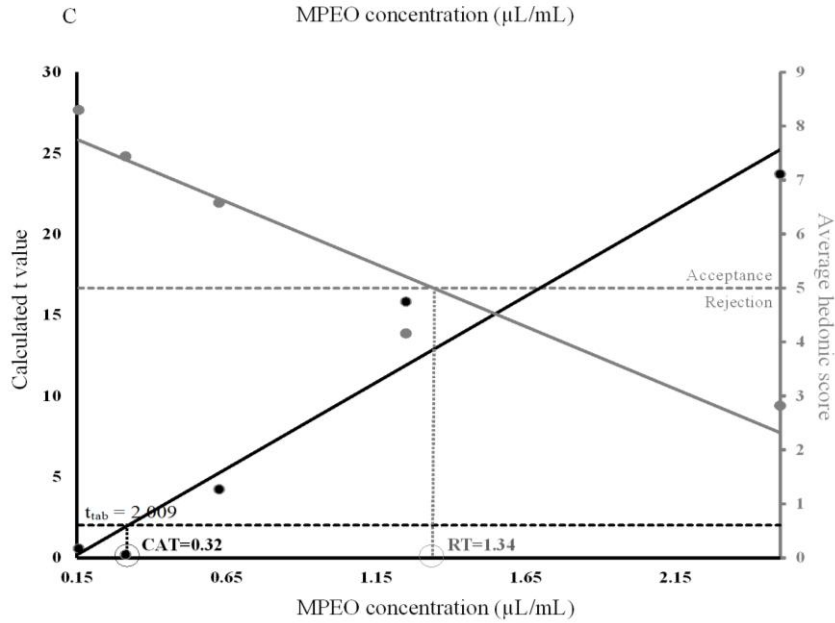
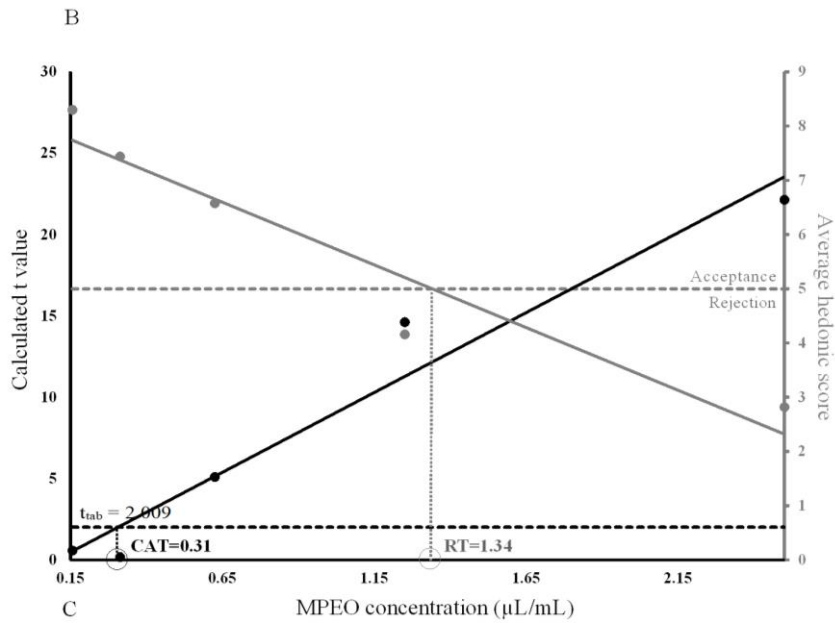
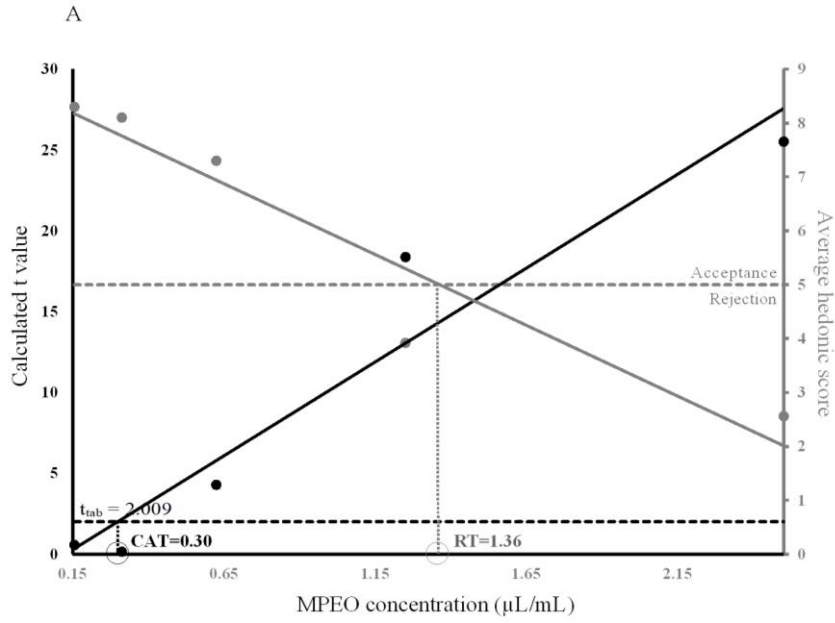


Figure 2. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Enteritidis PT4 (B) in cajá juice at 4 °C as a function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration: (*) control: 0 μL/mL; (○): 0.16 μL/mL; (●): 0.31 μL/mL; (□) 0.63 μL/mL; (■) 1.25 μL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. The dotted line represents the detection limit (2 log₁₀ CFU/mL).

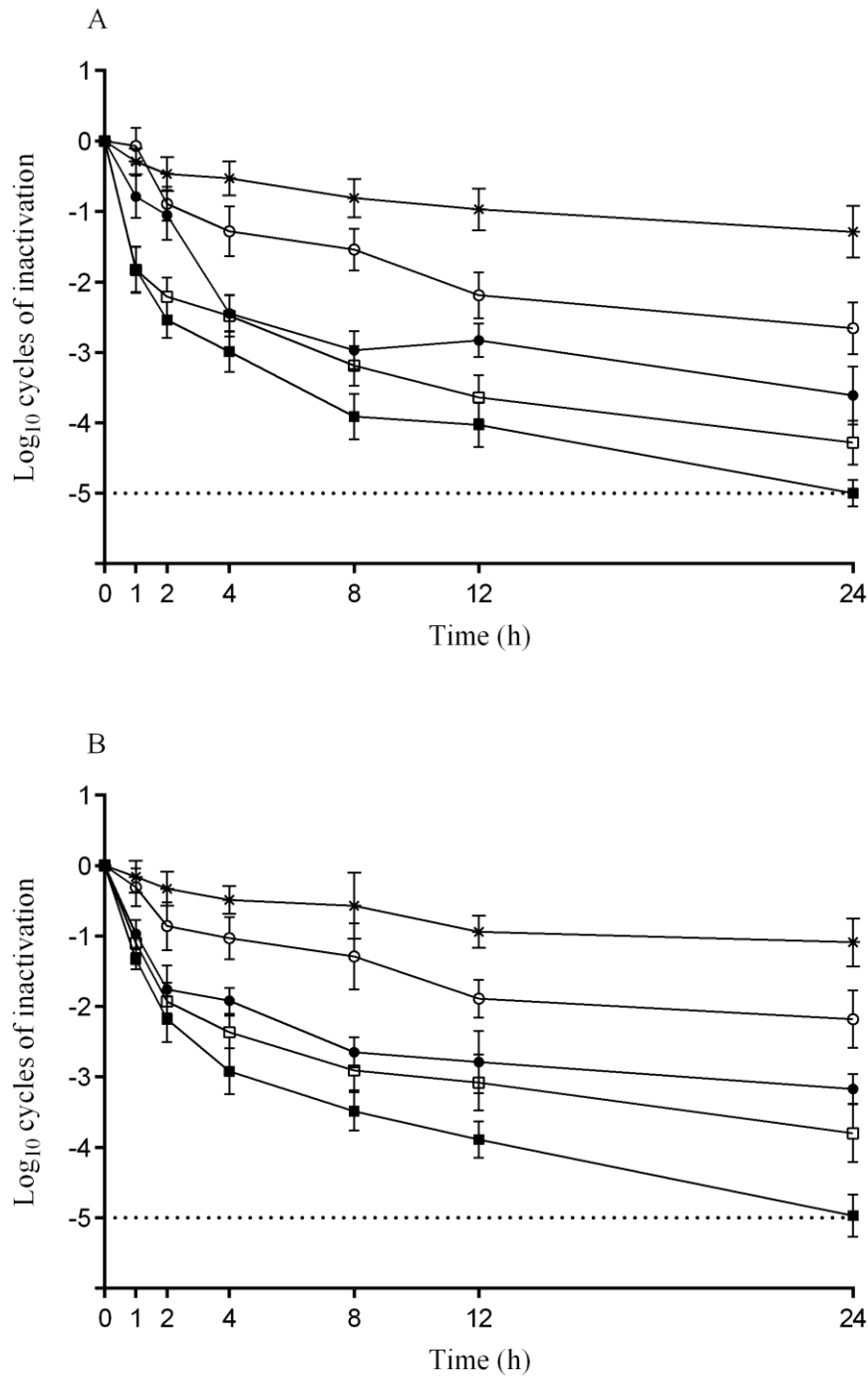


Figure 3. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Enteritidis PT4 (B) in guava juice at 4 °C as a function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration: (*) control: 0 μL/mL; (○): 0.16 μL/mL; (●): 0.31 μL/mL; (□) 0.63 μL/mL; (■) 1.25 μL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. The dotted line represents the detection limit (2 log₁₀ CFU/mL).

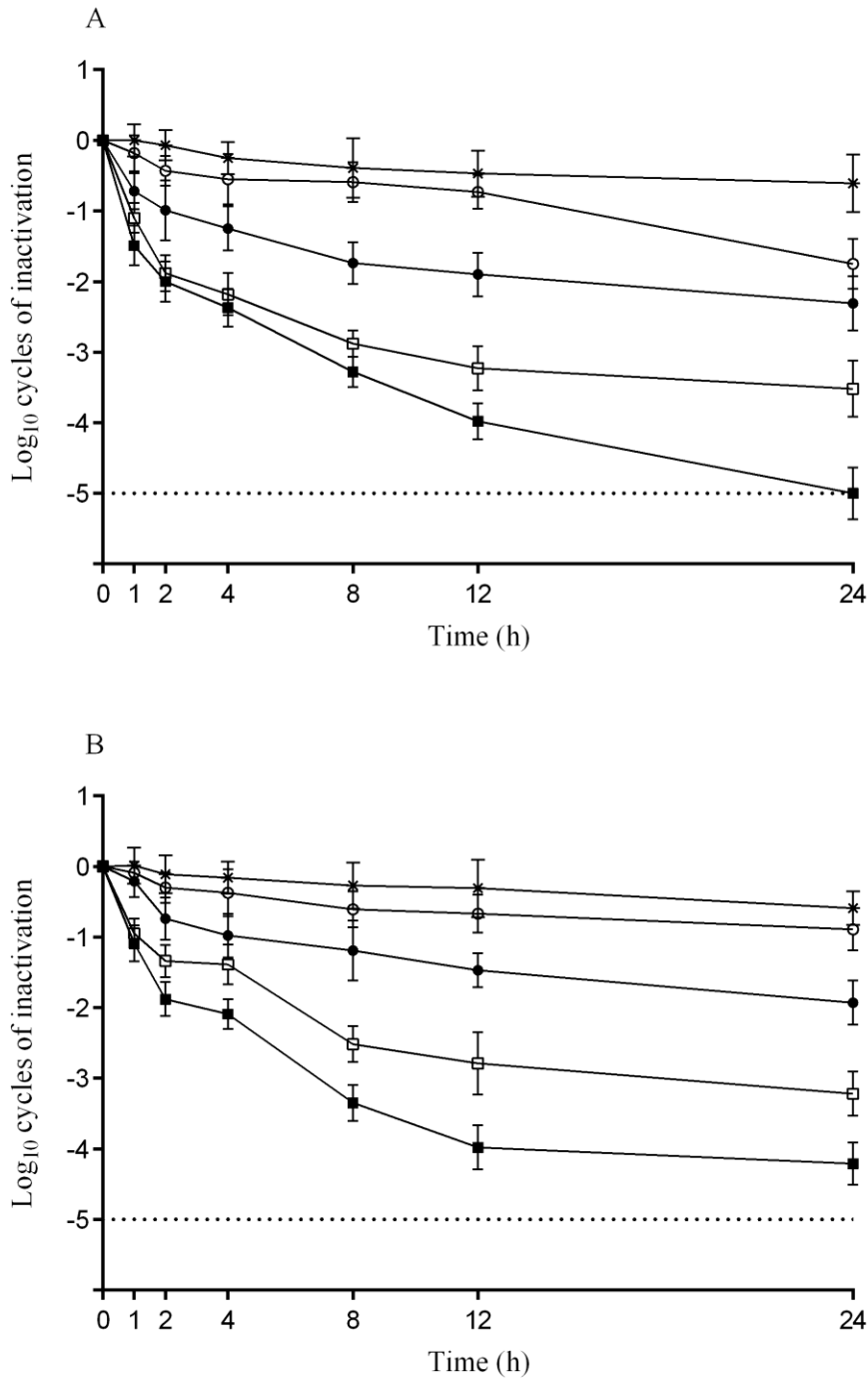


Figure 4. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 (A) and *Salmonella* Enteritidis PT4 (B) in mango juice at 4 °C as a function of *Mentha piperita* L. essential oil concentration: (*) control: 0 µL/mL; (○): 0.16 µL/mL; (●): 0.31 µL/mL; (□) 0.63 µL/mL; (■) 1.25 µL/mL. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. The dotted line represents the detection limit (2 log₁₀ CFU/mL).

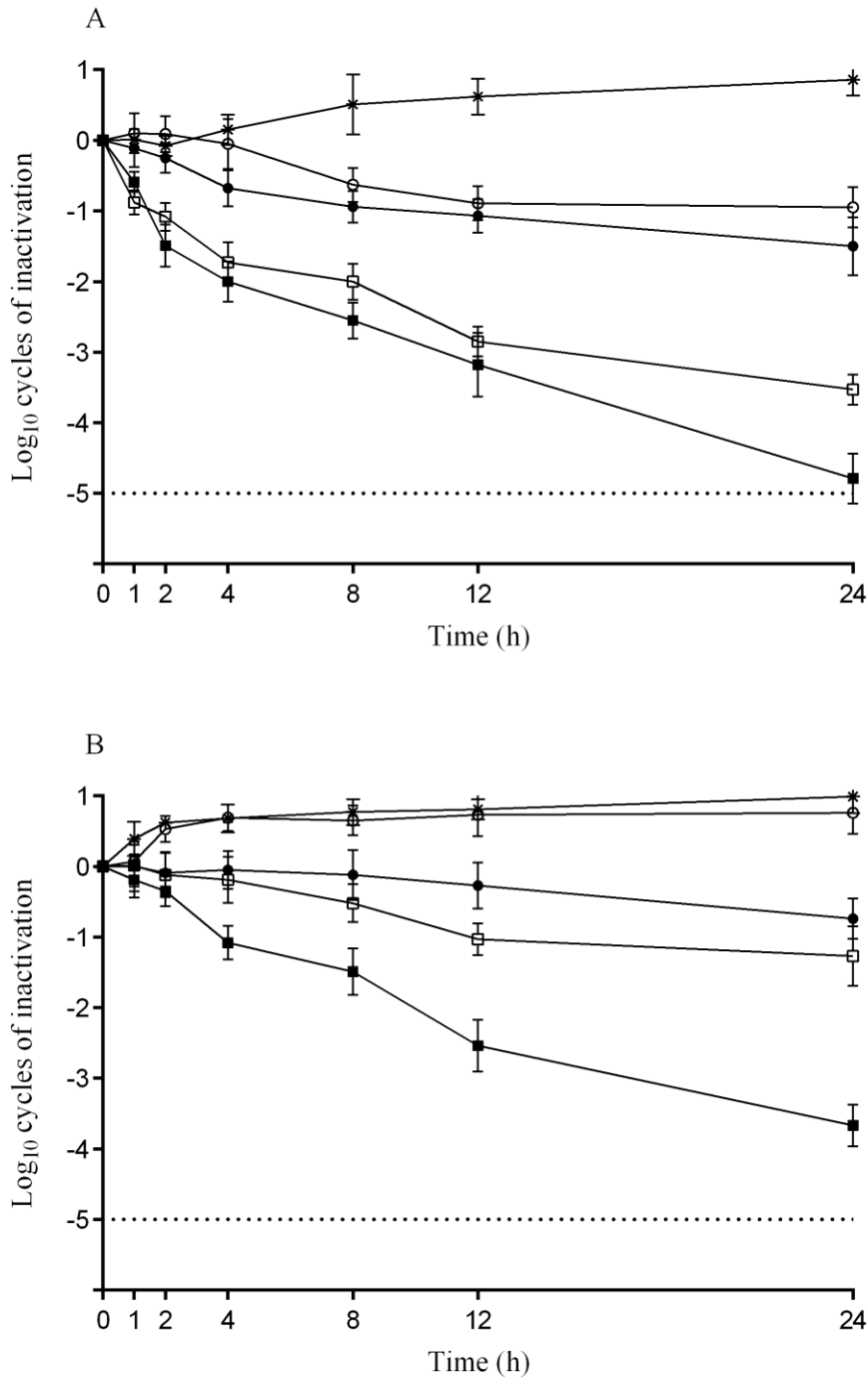
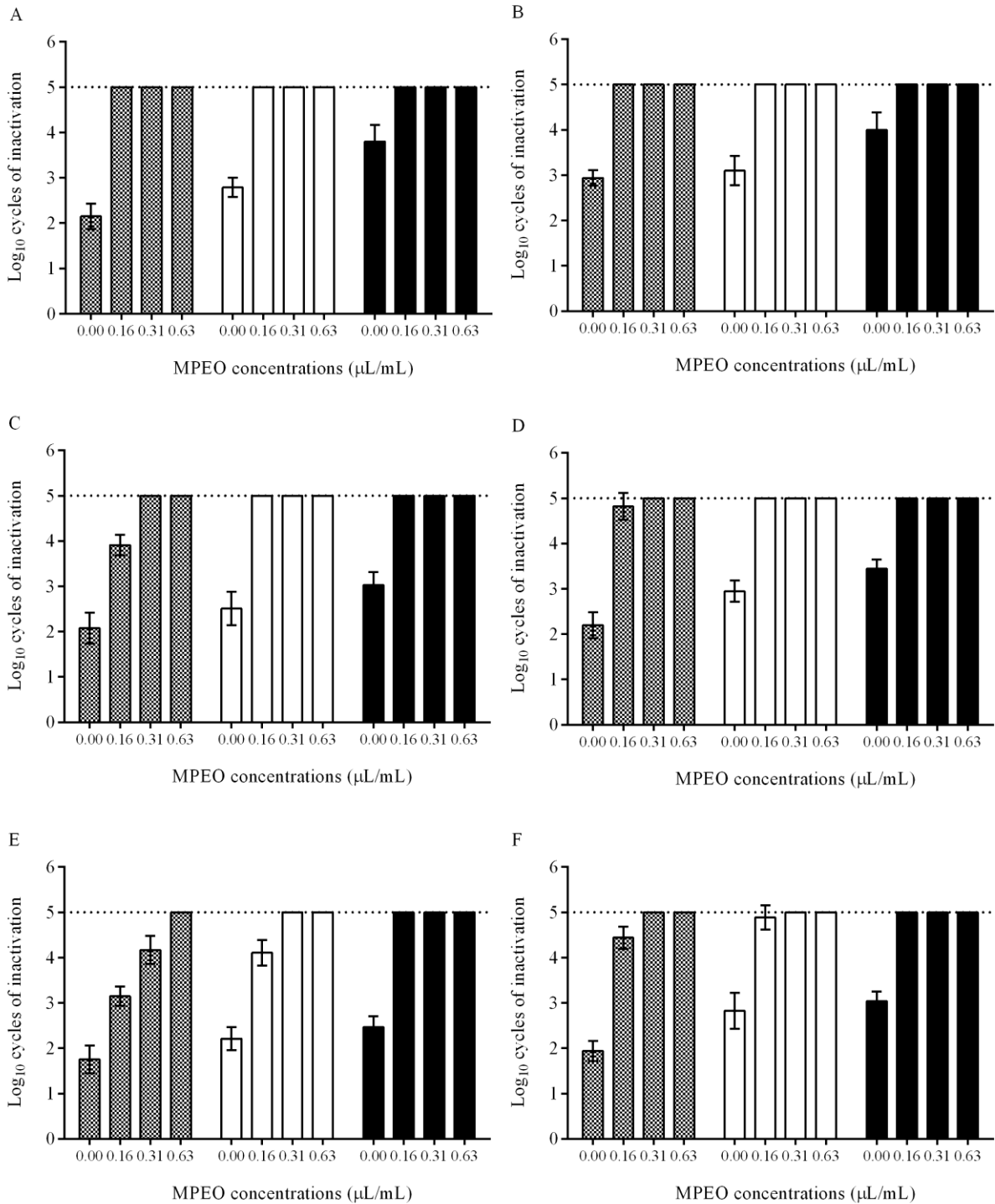


Figure 5. Log₁₀ cycles of inactivation of *Salmonella* Enteritidis PT4 (A, C, E) and *Escherichia coli* O157:H7 (B, D, F) after a heat treatment of 8 (dotted bars), 10 (white bars) and 12 (black bars) min at 54 °C alone or in combination with different concentrations (μL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in cajá (A, B), guava (C, D), and mango (E, F) juices. Data represent the means ± standard deviations (error bars) of at least three independent experiments. Detection limit of the test: 2.0 log₁₀ CFU/mL.



4.2 ARTIGO 2: Nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil in combination with mild heat and emerging technologies as an alternative to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices

Artigo submetido em Periódico Qualis A1 (Fator de Impacto 2,573)

Nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil in combination with mild heat and emerging technologies as an alternative to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices

Running title: Nanoemulsions of peppermint oil in combined treatments.

Abstract

This study was performed in order to obtain and characterize nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil (n-MPEO) and to assess their efficacy in combination with mild heat (MHT), pulsed electric fields (PEF), and high hydrostatic pressure (HHP) treatments in causing a 5- log₁₀ reduction in survival counts of *Escherichia coli* O157:H7 in guava and mango juices. The droplets of n-MPEO were < 200 nm and showed good stability for 4 months at 4 °C. The n-MPEO at 5.0 µL/mL displayed a more efficacious long-term antimicrobial activity than suspensions of MPEO (s-MPEO). Combined treatments of s-MPEO or n-MPEO and MHT, PEF, or HHP acted synergistically against *E. coli*. Nevertheless, combined treatments with n-MPEO showed the same or even higher efficacy than those with s-MPEO. Thus, by using nanoemulsions, lower doses of antimicrobial compounds or milder MHT, PEF, or HHP treatments can be applied, while still guaranteeing the microbial safety of tropical fruit juices.

Industrial relevance

The exploration of a series of different delivery systems of antimicrobial compounds in food products improves their antimicrobial efficacy and aids in the establishment of successful combined treatments for food preservation. The preparation of nanoemulsions of MPEO not only enhances the compound's stability, but also its antimicrobial efficacy. Valuable synergistic effects that can be observed when combining n-MPEO with MHT, PEF, or HHP reveal alternatives to traditional treatments that are successful because they help reduce treatment intensity, thereby helping to avoid adverse effects on juice quality without compromising food safety.

Keywords: natural antimicrobials; essential oils; nanoemulsions; emerging technologies; food preservation; tropical fruit juices

1. Introduction

The consumption of tropical fruit juices has been increasing worldwide, mainly because consumers are demanding healthy, fresh products that associate nutritional value with convenience (Neves, Trombin, Lopes, Kalaki, & Milan, 2011; Pereira et al., 2015; Petruzzi et al., 2017). Despite the intrinsic low pH of fresh fruit juices, they have been increasingly linked with food outbreaks (Callejón et al., 2015). *Escherichia coli* O157:H7 has been cited as a pathogen frequently involved in fruit juice outbreaks worldwide (CDCP, 2016; Choi et al., 2012; EFSA, 2015). It can survive in acidic foods and beverages such as fruit juices because of its acid-adaptability and its tolerance to certain organic acids (Lee, Kim, & Kang, 2015). The US Food and Drug Administration has identified *E. coli* O157:H7 as the most suitable pathogen for the evaluation of safety in fruit juices, and requires procedures that are capable of reducing at least 5 log₁₀ cycles in counts of this pathogen in the final product (FDA, 2001).

The use of plant essential oils (EOs) has been suggested as a technology that has promising potential for fruit juice preservation, particularly in view of consumers' increased wariness of chemical preservatives (e.g., sodium benzoate and potassium sorbate) (Basak, 2018; Seow, Yeo, Chung, & Yuket, 2014). Moreover, the high temperatures (72 to 82 °C for 0.3 to 15 seconds), usually applied to preserve fruit juices (FDA, 2004) cause undesirable changes in several quality parameters such as flavor and color. High temperatures also destroy heat-sensitive nutritional components (e.g. vitamins), thereby compromising product freshness (Hu, Zhou, Xu, Zhang, & Liaoet, 2013).

The main obstacle impeding the use of EOs in fruit juices is their strong taste and flavor (Macwan, Dabhi, Aparnathi, & Prajapati, 2016; Souza, Almeida, & Sousa Guedes, 2016). To attain the desired antimicrobial effects, the required EO concentration may cause undesired sensory changes that reach the rejection threshold of consumers (Hyldgaard, Mygind, & Meyeret, 2012). However, by combining EOs with traditional technologies, such as mild heat treatment (MHT), or emerging technologies, such as pulsed electric fields (PEF) or high hydrostatic pressure (HHP), antimicrobial efficacy can be achieved at lower EO concentrations: this is thus a recommendable strategy for the prevention of undesirable taste effects (Tyagi, A., Gottardi, D., Malik, A. & Guerzoni, M. E., 2013; Cherrat, Espina, Bakkali, Pagán, & Laglaoui, 2014). MHT can enhance the antimicrobial efficacy of EOs because it exerts an influence on the vapor phase formation of their volatiles, and thereby improves their solubilization in the cell membrane (Burt, 2004). Otherwise, PEF and HHP induce structural changes in the cell membrane via the formation of pores which, in turn, favor the diffusion of the EOs into the cell, resulting in damage to vital cell functions (Baptista, Rocha, Cunha,

Saraiva, & Almeida, 2016; Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, & Martín-Belloso, 2008).

It has been suggested, however, that the high reactivity and hydrophobicity of EOs represents a challenge to their direct incorporation in food and beverage products (Donsì & Ferrari, 2016). Therefore, new delivery systems designed to encapsulate and release EOs in food products, such as emulsion-based delivery systems based on emulsion phase inversion (EPI), could improve the dispersion of EOs into food products, minimize the phase separation, and thereby enhance their antimicrobial properties. Moreover, this methodology could be of great interest due to ease of implementation, lower equipment and operation costs, and higher energy efficiency (Komaiko & McClements, 2016). In this regard, Pagán, Berdejo, Espina, García-Gonzalo, and Pagán (2018) have assayed the antimicrobial effect of EPI nanoemulsions of citral in combination with heat or PEF in laboratory media, obtaining unexpected results: while nanoemulsions of citral were more effective when inhibiting or inactivating *E. coli* O157:H7 than citral used in form of suspensions, nanoemulsions did not offer any advantage when combined with mild heat or PEF.

Mentha piperita L. essential oil (MPEO) possesses strong activity against fruit-related pathogens and spoilers (Sousa Guedes et al., 2016). An earlier study reported that it shows good efficacy when applied in juices (Sousa Guedes et al., 2016); however, the doses required were relatively high, which might affect the juices' sensory characteristics. No previous studies have explored the potential of applying reduced doses of MPEO in the form of nanoemulsions combined with MHT, PEF, and HHP to preserve juices.

Therefore, the aims of this study were i) to obtain and characterize EPI nanoemulsions of MPEO (n-MPEO) in terms of stability and reproducibility and, ii) to assess the efficacy of MPEO as a function of the MPEO preparation procedure: n-MPEO vs. the use of a simple vigorous shaking method by vortex agitation (suspension of-MPEO; s-MPEO), each applied as a single hurdle or in combination with MHT, PEF and HHP, to cause ≥ 5 -log₁₀ reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 in guava and mango juices.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and growth conditions

Escherichia coli O157:H7 (VTEC - phage type 34) isolated by Dr. P. A. Chapman (Chapman et al., 1993) was used as test strain in the present study. The stock culture was maintained at - 80 °C in cryovials. Broth subcultures were prepared by inoculating one single colony from a plate into a test tube containing 5 mL of sterile tryptic soy broth (Biolife,

Milan, Italy) with 0.6% yeast extract added (Biolife) (TSBYE). After inoculation, the tubes were incubated under agitation (130 rpm; Selecta, mod. Rotabit, Barcelona, Spain) at 37 °C for 18 h to reach stationary growth phase. Thus, cells were harvested through centrifugation (4500 g x 15 min, 4 °C), washed twice with sterile saline solution (0.85% NaCl), and re-suspended in TSBYE to obtain standard cell suspensions with an optical density (OD) at 625 nm (OD_{625}) of 0.09 that provided viable counts of approximately $8 \log_{10}$ colony-forming units per milliliter (CFU/mL) (Leite et al., 2016). Prior to experiments, cells were re-centrifuged and re-suspended at a concentration of $7 \log_{10}$ CFU/mL in fruit juices with or without MPEO. This initial bacterial concentration was chosen in order to provide a number of viable cells that allow to measure ≥ 5 - \log_{10} reduction of the test pathogen under the assayed conditions.

2.2. Fruit juices

The guava (*Psidium guajava* L.) and mango (*Mangifera indica* L.) fruits were purchased from Fruits CMR, S.A. (Barcelona, Spain) in the commercial maturation stage and selected for similar shape and uniform color, with absence of mechanical damages and no visible signs of infection. The fruits were surface-disinfected through immersion in a sodium hypochlorite solution (150 ppm, pH 7.2 adjusted using 1 M NaOH) for 5 min, washed with sterile distilled water, and dried for 30 min in a biosafety cabinet. Subsequently, the fruits were aseptically peeled, cut into small pieces and crushed using a food processor (Robot-Coupe, Blixer 6 V.V., Burgundy, France). The fruit pulps were sealed and stored at -18 °C in 100 g-polypropylene bags. When required for assays, the fruit juices were prepared by mixing 100 g of the fruit pulp with distilled water (1:1 ratio) using a domestic blender (for 3 min). The obtained juices were centrifuged (12,500 g x 15 min, 4 °C) to separate the pulp from the remaining liquid. The supernatants were sterilized by autoclaving (121 °C, for 15 min) and used for subsequent assays (Sousa Guedes et al., 2016). The final pH of guava and mango juices used in these experiments was 3.9 and 4.5, respectively.

2.3. MPEO, direct addition procedure and preparation of nanoemulsions

The MPEO extracted through steam distillation (batch 187; density at 20 °C, 0.900; refractive index at 20 °C, 1.460; 40.41% of menthol, 19.78% of isomenthone, 8.68% of neomenthol, 6.72 of menthyl acetate and 6.53% of eucalyptol) was purchased from Ferquima Ind. Com. Ltd. (São Paulo, Brazil). A vigorous shaking method (Friedman, Henika, & Mandrellet, 2002) was used to prepare MPEO suspensions (s-MPEO) in guava and mango juices.

Nanoemulsions of MPEO (n-MPEO) were prepared by applying the catastrophic phase inversion method (Zhang, Zhang, Fang, & Liu, 2017), also known as the emulsion phase inversion (EPI) method. The n-MPEO were prepared from a mixture of oily phase by slowly adding aqueous phase with gentle magnetic agitation (1000 rpm). The aqueous phase was prepared by mixing 1.5 mL of ethanol (Sigma–Aldrich, USA) with 40.5 mL of sterile distilled water (Pagán, Berdejo, Espina, García-Gonzalo, & Pagán, 2018). The oily phase was prepared by mixing 3 mL of Tween 80 (Panreac, Barcelona, Spain) with 5 mL of MPEO. The addition rate of aqueous phase was kept constant at approximately 1.0 mL/min by using a burette. A water-in-oil (W/O) emulsion with a high oil-to-water ratio was formed; increasing amounts of water were subsequently added to the system with continuous stirring. The amount of water added to a W/O emulsion was progressively increased until a phase inversion occurred and an oil-in-water (O/W) emulsion was formed. Final concentration of MPEO in the nanoemulsion was 90 g/L.

2.4. Characterization, stability and reproducibility of n-MPEO

The nanoemulsions (n-MPEO) were characterized for droplet size and size distribution (polydispersity index-PDI) using a particle size analyzer (Brookhaven, 90 Plus, New York, USA). Droplet size was analyzed with the dynamic light scattering (DLS) technique. Prior to the experiments, the n-MPEO were diluted with water to eliminate multiple scattering effects. Emulsion droplet size was estimated by an average of three measurements and is presented as the mean diameter of volume distribution. Droplet size was evaluated after fresh preparation, and then after 1 and 4 months of storage at 4 °C. The reproducibility of the protocol for preparing the n-MPEO and their stability during 30 days was also evaluated by comparing the inactivation curves of *E. coli* O157:H7 (obtained weekly) in the presence of n-MPEO. Cells from stationary-phase cultures were added at final concentrations of 7 log₁₀ CFU/mL in mango juice with 5 µL/mL of n-MPEO. The different systems were gently hand-shaken for 30 s and maintained at room temperature (23 ± 2 °C). Samples were taken at preset intervals and survivors were enumerated as described below.

2.5. Evaluation of the antimicrobial activity of s-MPEO and n-MPEO

MPEO (s-MPEO and n-MPEO) were evaluated to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and to obtain survival curves of *E. coli* O157:H7. The MIC values were determined using a microdilution in broth assay (CLSI, 2015). Approximately 50 µL of TSAYE with different concentrations of s-MPEO or n-MPEO (0.312 - 20 µL/mL) were

dispensed into each well of a 96-well microplate. Subsequently, 50 μL aliquots of bacterial suspension were added to each well (final viable counts of $6 \log_{10}$ CFU/mL). Negative control (growth media non-inoculated with the test pathogen), positive control (growth media inoculated with the test pathogen), and diluent control (the amount of ethanol corresponding to the maximum n-MPEO concentration assayed – 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were also prepared. The microplate was loosely wrapped with cling wrap to prevent bacterial dehydration and s-MPEO or n-MPEO volatilization, and incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was confirmed as the lowest s-MPEO or n-MPEO concentration capable of inhibiting visible bacterial growth (Carvalho et al., 2015).

To assess the inactivating effect of n-MPEO and s-MPEO against *E. coli* O157:H7 in mango and guava juices, cells from stationary-phase cultures were added at final concentrations of $7 \log_{10}$ CFU/mL in guava and mango juices with n-MPEO and s-MPEO MIC values (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$). The different systems were gently hand-shaken for 30 s and maintained at room temperature (23 ± 2 °C). At intervals of 0 (just after homogenization), 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 min of treatment, samples were taken and survivors were enumerated.

2.6. Application of combined preservation processes: MHT, PEF or HPP and MPEO

2.6.1 MHT and MPEO

Cell inactivation of *E. coli* O157:H7 caused by MPEO in combination with MHT (50, 52 and 54 °C) after 10 min of exposure was assessed. Exposure time intervals and temperature were selected based on results of previous studies featuring the combination of EOs and MHT to preserve juices (Espina et al., 2011; Espina et al., 2012). The concentrations 0.16, 0.31, and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of MPEO selected for this study lay below the rejection threshold in sensory tests (unpublished results). Aliquots of 5 mL of each cell suspension prepared in guava and mango juices with and without MPEO were placed in a shaking bath thermostated at 50, 52 and 54 °C ± 0.2 °C (140 rpm; model 1620; Bunsen, mod. BTG, Madrid, Spain). The MPEO was added once the treatment media was tempered, prior to microbial inoculation. After treatment, cell suspensions were extracted, immediately placed on ice, and survivors were evaluated as described below.

2.6.2. PEF treatments and MPEO

PEF treatments were carried out using ScandiNova equipment (Modulator PG, ScandiNova, Uppsala, Sweden) described by Saldaña, Puértolas, Condón, Álvarez, and Raso

(2010). An aliquot of 0.5 mL of the microbial suspensions prepared in guava and mango juices (electrical conductivity of 1.9 and 1.2 mS/cm, respectively) with and without s-MPEO or n-MPEO (0.16, 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) was placed into the treatment chamber with a sterile syringe. Exponential waveform pulses at an electrical field strength of 20, 25 and 30 kV/cm and a pulse repetition rate of 1 Hz were used in this study. The specific energy input of each pulse was 2.3 kJ/kg, 3.6 kJ/kg and 5.1 kJ/kg in guava juice and 1.4 kJ/kg, 2.3 kJ/kg and kJ/kg in mango juice, respectively. Cell suspensions were treated for 50 pulses (pulse width 3 μs). Experiments began at room temperature (23 ± 2 °C), and in all experiments the temperature of the samples after the application of 50 pulses was lower than 35 °C. After treatment, samples were taken, and survivors were evaluated.

2.6.3. HHP treatments and MPEO

HHP treatments were carried out following the procedure described by Espina, García-Gonzalo, Laglaoui, Mackey, and Pagán (2013). Cell suspensions (1 mL each) prepared in guava and mango juices with and without s-MPEO or n-MPEO (0.16, 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) were placed in sterile plastic pouches that were heat sealed and kept on ice before pressurization. Cell suspensions were pressure-treated in a 300-mL pressure vessel (model S-FL-085-9-W; Stansted Fluid Power, Stansted, United Kingdom) at room temperature (23 ± 2 °C). The pressure-transmitting fluid was monopropylene glycol-water (30:70). Cell suspensions were exposed to pressures of 150, 200, and 300 MPa for 15 min. The maximum temperature reached during pressurization was 30 °C. After decompression, the pouches were removed from the unit and placed on ice until survivors were evaluated.

2.7. Counts of viable cells

After treatment, samples were adequately diluted in 0.1% w/v peptone water (Biolife). Subsequently, 20 μL -aliquots of each dilution were inoculated onto Tryptic Soy Agar (Biolife) with 0.6% Yeast Extract added (Biolife) (TSAYE) using the microdrop technique (Herigstad, Hamilton, & Heersinket, 2001). Inoculated control samples without s-MPEO or n-MPEO were similarly assayed. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Previous experiments showed that longer incubation times did not influence the surviving cell counts. The results were expressed as \log_{10} CFU/mL. The detection limit was 2 \log_{10} CFU/mL for all experiments and strains tested.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed to determine significant differences ($p \leq 0.05$) using ANOVA, followed by post-hoc Tukey's test or Student's t-test. For MIC determination assays, the results are expressed as modal values because the MIC values were the same in all repetitions. The error bars in the figures indicate the mean \pm standard deviation from the data obtained from at least three independent experiments. All statistical analyses were performed using Sigma Stat 3.5 computer software (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

3. Results

3.1 Characterization, stability and reproducibility of n-MPEO

In the nanoemulsions (n-MPEO), droplet size remained below 200 nm during all 4 months of storage, and the PDI values were normally ≤ 0.32 (Table 1). No significant differences ($p \leq 0.05$) were observed between the inactivation of *E. coli* O157:H7 in mango juice induced by the fresh preparations of n-MPEO (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and by n-MPEO stored at 4 °C up to 4 months (Fig. 1), which indicates that the EPI method assayed allows the obtainment of reproducible and stable nanoemulsions of MPEO.

3.2. Evaluation of the antimicrobial activity of s-MPEO and n-MPEO

The MIC value of n-MPEO or s-MPEO against *E. coli* O157:H7 was 5.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. This value was used in an experiment conducted to compare the effect of the addition of n-MPEO and s-MPEO in the inactivation of 5 log₁₀ of *E. coli* O157:H7 in mango and guava juices. Although the MIC value was similar for n-MPEOs and s-MPEOs, the study of cell inactivation indicated that the n-MPEOs showed a more efficacious long term antimicrobial activity compared to the s-MPEOs (Fig. 2): while the inactivation of 5-log₁₀ of *E. coli* O157:H7 in guava and mango juices using 5.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of s-MPEO required 90 and 100 min respectively, in the presence of n-MPEO it was achieved after 70 and 90 min, respectively (20 min reduction).

3.3. Application of combined preservation processes: MHT, PEF, or HPP

Figures 3, 4 and 5 show the log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 in guava and mango juices after different combined preservation treatments based on the simultaneous application of MHT (Fig. 3), PEF (Fig. 4), or HHP (Fig. 5) and s- or n-MPEO at three different concentrations (0.16, 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$). As a control, the figures include the degree of inactivation achieved by MHT, PEF, or HHP acting as single hurdles (0). Due to the

insignificant inactivation caused by s- or n-MPEO applied directly at the highest concentration tested (0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (data not shown), the comparison of the degree of inactivation achieved by MHT, PEF, or HHP acting as single hurdles and in combination with s- or n-MPEO allowed us to ascertain lethal synergistic effects associated with a higher degree of inactivation ($p \leq 0.05$) achieved as a result of the combined treatment.

MHT at 54 °C for 10 min caused a 2.7 \log_{10} and 2.3 \log_{10} reduction of *E. coli* O157:H7 in guava (Fig. 3C) and mango (Fig. 3F) juices, respectively. The higher degree of inactivation observed when combining MHT at 54°C with s- or n-MPEO in comparison with MHT acting as a single hurdle ($p \leq 0.05$) indicates synergism between the hurdles at any MPEO concentration tested. MHT at 54 °C combined with 0.16, 0.31, and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of s- and n-MPEO caused a 5 \log_{10} reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 in guava juice (Fig. 5C). In mango juice (Fig. 5F), MHT at 54 °C combined with 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of s- and n-MPEO also caused a 5 \log_{10} reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7. However, the combination of MHT at 54 °C with 0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of s-MPEO caused an approximately 4 \log_{10} reduction of *E. coli* O157:H7. In order to ensure the desired 5 \log_{10} reduction at 54°C at the lowest MPEO concentration, it was necessary to use MPEO in the form of nanoemulsion.

In both juices, milder heat treatments at 50 (Fig. 3A and 3D) and 52 °C (Fig. 3B and 3E) for 10 min caused $< 1 \log_{10}$ reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7. The degree of inactivation when combining MHT at 50 or 52 °C with n-MPEO was higher at any concentration tested ($p \leq 0.05$), with the exception of 0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ n-MPEO and 50 °C in mango juice (Fig. 3D). Overall, the inactivation achieved with n-MPEO instead of s-MPEO was greater, showing significant differences ($p \leq 0.05$) when applying 0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of s- and n-MPEO in guava and mango juices. Despite the synergistic lethal effects observed at all tested concentrations, combined treatments at temperatures lower than 54°C did not achieve a 5 \log_{10} reduction of *E. coli* O157:H7.

Results obtained with PEF treatments (Fig. 4) acting as a single agent show an inactivation of 2.3 – 4.2 \log_{10} cycles of *E. coli* O157:H7 as a function of treatment intensity (150 μs at 20, 25 or 30 kV/cm) and of the juice assayed. The combination of PEF and MPEO achieved a 5- \log_{10} reduction of *E. coli* O157:H7 at the highest electrical field strength tested (30 kV/cm) (Fig. 4C and 4F). Nevertheless, that degree of inactivation was achieved by both s- or n-MPEO in guava juice (Fig. 4C) at all tested MPEO concentrations, but only at the maximum concentrations tested (0.31 and 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in mango juice (Fig. 4F). In the latter, only the use of MPEO in the form of nanoemulsion at the lowest concentration (0.16 $\mu\text{L}/\text{mL}$) allowed us to achieve the desired 5 \log_{10} reduction ($p \leq 0.05$).

Reduction of the electrical field strength to 25 kV/cm also achieved a 5 log₁₀ reduction when combined with n-MPEO in all tested concentrations, and with s-MPEO at the highest concentration (0.63 µL/mL) tested in guava juice (Fig. 4B), and when combining with s- or n-MPEO at 0.63 µL/mL and with n-MPEO at 0.31 µL/mL in mango juice (Fig. 4E). Synergism between the hurdles was clearly noticeable in guava and mango juice at the highest concentration of n-MPEO (0.63 µL/mL) tested ($p \leq 0.05$).

At the lowest electrical field strength (20 kV/cm) (Fig. 4A and 4D), the synergistic effect when combining with MPEO was remarkable, especially with MPEO in the form of nanoemulsion ($p \leq 0.05$) and with s-MPEO at the highest concentrations tested: 0.63 µL/mL in guava juice, and 0.31 and 0.63 µL/mL in mango juice ($p \leq 0.05$). The combined use of PEF at 20 kV/cm and 0.16 and 0.31 µL/mL of s-MPEO caused a degree of inactivation similar to that achieved by PEF treatment acting as a single hurdle (3 log₁₀ reduction approx. in survival counts of *E. coli* O157:H7); however, the combination of PEF and 0.16 and 0.31 µL/mL of n-MPEO helped to achieve 1 extra log₁₀ reduction ($p \leq 0.05$) (around 4 log₁₀ reduction in both juices). The synergism was at its maximum at the highest tested concentration (0.63 µL/mL) of n-MPEO, inducing the inactivation of more than 2 extra log₁₀ cycles in guava (Fig. 4A) and mango juices (Fig. 4D) ($p \leq 0.05$).

Regarding HHP treatments, the results show that 300 MPa for 15 min applied as a single hurdle caused a 5 log₁₀ reduction of *E. coli* O157:H7 in guava juice (Fig. 5C) and a 4.2 log₁₀ reduction in mango juice (Fig. 5F). The 5 log₁₀ reduction in mango juice was achieved after combining with s-MPEO or n-MPEO at 0.31 and 0.63 µL/mL, or only with n-MPEO at the lowest concentration (0.16 µL/mL) tested ($p \leq 0.05$).

HHP at 200 MPa for 15 min caused a 3.8 log₁₀ reduction of *E. coli* O157:H7 in guava juice (Fig. 5B), and 3.4 log₁₀ in mango juice (Fig. 5E). Again, a synergistic lethal effect was observed when combining with MPEO, especially in the form of nanoemulsion ($p \leq 0.05$). The combination of HHP and n-MPEO at 0.31 and 0.63 µL/mL caused the inactivation of 5 log₁₀ cycles of *E. coli* O157:H7 in both juices. The use of s-MPEO only accomplished the objective of 5 log₁₀ reduction at the highest concentration (0.63 µL/mL) tested in both juices, and at 0.31 µL/mL in guava juice.

Finally, the application of 150 Mpa of pressure for 15 min was not intense enough to cause a significant microbial inactivation (1 log₁₀ reduction approx.) (Fig 5A and 5D). A synergistic lethal effect was only observed when combining with n-MPEO at 0.31 µL/mL and with s- or n-MPEO at the highest concentration (0.63 µL/mL) tested ($p \leq 0.05$), achieving less than 1 extra log₁₀ cell cycle when combining with s-MPEO, and more than 2 extra log₁₀ cell

cycles with n-MPEO in guava (Fig. 5A) and mango juice (Fig. 5D). Nevertheless, no combined treatment at 150 MPa allowed us to achieve a 5 log₁₀ reduction of *E. coli* O157:H7 in guava and mango juice.

4. Discussion

Particles with a diameter of < 200 nm, organized into two immiscible phases (a dispersed and a continuous phase) as in this study, are characterized as nanoemulsions (McClements, 2012). The polydispersity index (PDI) describes the variation in size of a given emulsion, ranging from 0 to 1 (Ragelle et al., 2012). A low PDI stands for a relatively narrow distribution of EO droplets in aqueous systems, indicating a more stable emulsion state (Basak & Guha, 2017a; Topuz et al., 2016; Kang & Song, 2018). In the present study, PDI values were generally ≤ 0.32, indicating that all of the MPEO nanoemulsions remained within a relatively narrow range of size distribution with a good stability.

The similar survival curves of *E. coli* O157:H7 obtained in mango juice ($p \leq 0.05$) when applying either freshly prepared n-MPEO or n-MPEO stored up to 4 months at 4 °C (Fig. 1) indicated that the EPI method assayed allowed us to obtain reproducible and stable nanoemulsions. To the best of our knowledge, this is the first study to have used MPEO nanoemulsions prepared via EPI method. Earlier studies reported good stability of nanoemulsions of individual constituents of essential oils such as D-limonene (up to 90 days) (Zhang, Vriesekoop, Yuan, & Liang, 2014) and citral (up to 120 days) (Pagán, Berdejo, Espina, García-Gonzalo, & Pagán, 2018) using the same method.

In the present study, no differences were observed between MIC values of s-MPEO and n-MPEO, thereby indicating that the preparation method for the nanoemulsions neither compromised nor improved the bacteriostatic activity of the EO. Earlier studies have reported that the use of D-limonene in nanoemulsions enhanced that compound's bacteriostatic activity against *L. delbrueckii*, *S. cerevisiae* and *E. coli* (Donsì, Annunziata, Sessa, and Ferrari, 2011) as well as that of citral when used against *E. coli* O157:H7 (Pagán, Berdejo, Espina, García-Gonzalo, & Pagán, 2018).

Regarding bactericidal activity, the time required to inactivate 5 log₁₀ cells cycles of *E. coli* O157:H7 in mango and guava juices was shorter in assays with n-MPEO than with s-MPEO at the same concentration (5 µL/mL) (Fig. 2A and 2B). This would indicate that the preparation of EPI nanoemulsions of MPEO is a procedure that is not only capable of improving this essential oil's stability, but also its antimicrobial activity. Similar results were reported for nanoemulsions and suspensions of a peppermint essential oil (PEO) blended with

virgin coconut oil at MIC value (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) against *L. monocytogenes* and *S. aureus* in lab media (Liang et al., 2012) and for nanoemulsions of citral against *E. coli* O157:H7 (Pagán, Berdejo, Espina, García-Gonzalo, & Pagán, 2018). It is reported that the use of nanoemulsions improves the miscibility of the hydrophobic constituents of EOs, thereby increasing their constituents' chemical and physical stability (Oliveira et al., 2017): this might likewise facilitate long-term antimicrobial activity. According to Wu, Lin, and Zhang (2014), emulsions with droplets in the nano range can efficiently permeate the porin proteins of the outer membrane of the bacterium, thus effectively delivering EOs and leading to a higher antimicrobial efficacy, as observed here.

The efficacy of n-MPEO or s-MPEO (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) against *E. coli* O157:H7 varied with the juice assayed. In guava juice, s-MPEO inactivated the required 5 \log_{10} cell cycles after 90 min of exposure, and in mango juice this inactivation occurred after 100 min of exposure. The same occurred when using n-MPEO. It was necessary to apply 70 min of exposure in order to inactivate 5 \log_{10} cycles in guava juice and 80 min in mango juice, thus reinforcing the effects of the food matrix – mainly in relation to pH, which was lower in guava juice (3.9) than in mango juice (4.5) – on the antibacterial action of MPEO. The hydrophobicity of EOs typically increases at lower pH values, enabling them to dissolve more readily into the cell membrane lipids of the target bacteria (Schelz, Molnar, & Hohmannet, 2006).

Although MPEO achieved the inactivation of 5 \log_{10} cycles of *E. coli* O157:H7 in guava and mango juice, the treatment required more than 1 h of incubation at 37 °C and doses (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) lying well above the sensory threshold for this EO (0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in both juices (data not shown). Therefore, in this study the use of MPEO at greatly reduced concentrations (≤ 0.63 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in combination with MHT, or with emerging technologies such as PEF or HHP, has been proposed for the efficacious preservation of guava and mango juice.

Researchers have demonstrated remarkable synergistic lethal effects when combining MHT, PEF, or HHP with EOs at very low EO doses (Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, & Martín-Belloso, 2008; Espina et al., 2012; Espina, García-Gonzalo, Laglaoui, Mackey, & Pagán, 2013). However, some studies have pointed out the lack of stability of these hydrophobic compounds and the lack of treatment homogeneity when EOs are added to aqueous systems, and have suggested that it is preferable to use nanoemulsions (Basak & Guha, 2017b; Donsì & Ferrari, 2016; Donsì, Annunziata, Sessa, & Ferrari, 2011).

As mentioned before, EO nanoemulsions, resulting from different preparation methods, have previously been reported to be effective against microorganisms (Liang et al., 2012; Zhang, Vriesekoop, Yuan, & Liang, 2014; Zhang, Zhang, Fang, & Liu, 2017; Ziani,

Chang, McLandsborough, & McClements 2011). However, few studies have evaluated their behavior when combined with other technologies such as MHT, PEF, or HHP.

Our results show the occurrence of synergistic lethal effects achieved through the application of MHT, PEF, or HHP in combination with both s-MPEO and n-MPEO. The magnitude of the synergism depends on the technology, on the form of MPEO (in suspension or nanoemulsion), and on the concentration applied.

Overall, combined treatments with MHT, PEF, or HHP and n-MPEO showed the same or even greater lethality against *E. coli* O157:H7 than those with s-MPEO: thus, under these circumstances, the use of nanoemulsions also seemed to facilitate the access of EOs to the cells to cause their inactivation. Thus, the use of nanoemulsions allowed us to propose lower doses of antimicrobial or milder MHT, PEF or HHP treatments to achieve a 5 log₁₀ reduction in survival counts of *E. coli* O157:H7 in guava and mango juices. For instance, while the inactivation of 5 log₁₀ cycles of *E. coli* O157:H7 by PEF (35 kV/cm-150 μs) and s-MPEO in mango juice required 0.31 μL/mL (Fig. 4F), the same lethal effect was achieved with a lower concentration (0.16 μL/mL) of n-MPEO ($p \leq 0.05$). In guava juice, similar results were obtained at 30 kV/cm (Fig. 4B): it was possible to maintain the lethal effect with 0.31 μL/mL of s-MPEO or 0.16 μL/mL of n-MPEO ($p \leq 0.05$). Moreover, the use of nanoemulsions in guava juice also allowed us to reduce the intensity of the PEF treatment from 35 to 30 kV/cm in combination with 0.31 μL/mL of n-MPEO ($p \leq 0.05$) (Fig. 4B and 4C), while still achieving the desired safety objective (a 5 log₁₀ reduction of *E. coli* O157:H7).

The differences in pH or conductivity (in the case of PEF treatment) among juices did not affect the efficacy of MHT, PEF, or HHP acting as single agents against *E. coli* O157:H7, since no differences were observed ($p \leq 0.05$) among the number of survivors obtained after the application of each technology in both juices, with the exception of HHP at 300 MPa. However, combined treatments, especially PEF or HHP in conjunction with MPEO, achieved a generally greater degree of inactivation in guava juice (pH 3.9) than in mango juice (pH 4.5). This rather negligible variation in pH did not seem to influence the physical technologies' inactivation mechanism, but the lower pH of guava juice might be responsible for a greater hydrophobicity of the EOs, thereby improving their antimicrobial action (Schelz, Molnar, and Hohmannet, 2006), and, thus, their effectivity in combined treatments.

Moreover, the examination of the occurrence of sublethal injury after MHT, PEF, or HHP by using the selective recovery medium technique (data not shown) revealed a slightly higher percentage of sublethally injured cells in the outer and cytoplasmic membranes of *E. coli* O157:H7 when suspended in guava juice than in mango juice, as a function of treatment

intensity. According to previous reports (Burt, 2004; Espina et al., 2011; Hyldgaard, Mygind, & Meyeret, 2012), the occurrence of sublethal injuries at the cell envelope level might facilitate the access of EO constituents to the cell targets: thus, the greater sensitivity of sublethally injured cells to the EOs' action might also facilitate a more effective synergism among the hurdles observed in guava than in mango juice. Thus, the achievement of the safety objective was reached in guava juice at lower HHP and PEF treatment intensities than in mango juice, and also at a lower MPEO concentration in combination with MHT or PEF. Pagán, Berdejo, Espina, García-Gonzalo, and Pagán (2018) observed that the use of nanoemulsions of citral (n-citral; prepared by EPI method) did not affect the slight synergism observed when citral and PEF were combined (150 μ s, 30 kV/cm) to inactivate *E. coli* O157:H7 Sakai in lab media (pH 7.0 and 4.0). In contrast, when combined with heat (53 °C), they observed a greater synergistic effect of s-citral rather than of n-citral, either in lab media (pH 7.0 and 4.0) or in apple juice. According to the authors, in the case of citral, the vigorous agitation applied would have been sufficient to disperse it correctly and favour its antimicrobial activity during the short duration of the combined treatment. Our results with MPEO showed the opposite behavior. The use of the EPI method to prepare nanoemulsions of a complex mixture of constituents, such as MPEO, does not impair but maintains or even reinforces their antimicrobial effectivity in combination with MHT, PEF or HHP. These results show that the behavior of nanoemulsions of different EOs or EO constituents might vary as a function of their chemical characteristics, of their use as a single hurdle or in combined treatments, and of the food matrix. Therefore, further research is needed in order to assess which is the best EO nanoemulsion preparation procedure for food preservation.

To summarize: the results obtained in this study contribute to scientific knowledge regarding the effect of combined treatments of MHT, PEF, or HHP and n-MPEO with the purpose of ensuring the microbiological safety of fruit juices and reducing the risk of food-borne illness.

5. Conclusion

The use of MPEO nanoemulsions prepared by EPI method displayed good physical stability and antimicrobial activity. MPEO was generally more effective in guava than in mango juice. Both s-MPEO and n-MPEO acted synergistically in combination with MHT, PEF and HHP against *E. coli* O157:H7. The efficacy of s-MPEO and n-MPEO in reducing 5- \log_{10} of *E. coli* O157:H7 when combined with MHT, PEF, or HHP varied with the tested concentrations, treatment intensity, and the food matrix. Nevertheless, in guava and mango

juices, combined treatments with MPEO in the form of nanoemulsion showed the same or even higher efficacy than those with s-MPEO, thus suggesting that the use of n-MPEO in combination with mild heat and with the emerging technologies tested here in can be regarded as a promising method to ensure microbial safety in fruit juices.

6. Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES-Brazil (Doctoral Sandwich Program Abroad; Process Number 88881.134436/2016-01) for financial support and scholarship awarded to R.J. de Carvalho. We also extend our thanks to the CICYT (Spanish Interministerial Commission of Science and Technology, Project No. AGL2015-69565-P), to FEDER, the European Social Fund, and to the Aragonese Office of Science, Technology and University Research for financial support.

References

- Baptista, I., Rocha, S.M., Cunha, A., Saraiva, J.A., & Almeida, A. (2016). Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: an overview. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 128-149.
- Basak, S. (2018). The use of fuzzy logic to determine the concentration of betel leaf essential oil and its potency as a juice preservative. *Food Chemistry*, 240, 1113-1120.
- Basak, S. & Guha, P. (2017a). Betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil microemulsion: Characterization and antifungal activity on growth, and apparent lag time of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *LWT- Food Science and Technology*, 75, 616-623.
- Basak, S. & Guha, P. (2017b). Use of predictive model to describe sporicidal and cell viability efficacy of betel leaf (*Piper betle* L.) essential oil on *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* and its antifungal activity in raw apple juice. *LWT- Food Science and Technology*, 80, 510-516.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C., & Troncoso, A.M. (2015). Reported foodborne outbreaks due to fresh produce in the United States and European union: Trends and causes. *Foodborne Pathogens Disease*, 12, 32-38.
- Carvalho, R.J., Souza, G.T., Honório, V.G., Sousa, J.P., Conceição, M.L., Magnani, M., & Souza, E.L. (2015). Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil

- against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, 52, 59-65.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Outbreak Online Database (FOOD). (2016) <https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> Accessed 5 October 2017.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Wright, D.J., Norman, P., Fox, J., & Crick, E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiology & Infection*, 111, 439-447.
- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagán, R., & Laglaoui, A. (2014). Chemical composition, antioxidante and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 221-229.
- Choi, M.R., Liu, Q., Lee, S.Y., Jin, J.H., Ryu, S.R., & Kang, D.H. (2012). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in apple juice with gaseous ozone. *Food Microbiology*, 32, 191-195.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, CLSI Document M07-A10. 10th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1908-1914.
- Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106-120.
- Donsì, F., Marchese, E., Maresca, P., Pataro, G., Vu, K.D., Salmieri, S., Lacroix, M., & Ferrari, G. (2015). Green beans preservation by combination of a modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil with high pressure or pulsed light processing. *Postharvest Biology and Technology*, 106, 21-32.
- Espina, L., García-Gonzalo, D., Laglaoui, A., Mackey, B.M., & Pagán, R. (2013). Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit Juices. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 23-30.
- 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. *Journal of Food Microbiology*. 159, 9-16.

- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896-902.
- European Food Safety Authority. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13, 1–165.
- Food and Drug Administration (FDA). (2001). Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juices; final rule. *Federal Register*, 66, 6138–6202.
- Food and Drug Administration (FDA). (2004). Guidance for industry: juice HACCP hazards and controls guidance. 1st ed. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm>. Accessed 25 October 2017.
- Friedman, M., Henika, P.R., & Mandrell, R.E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 1545-1560.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J., (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 121–129.
- Hu, W., Zhou, L., Xu, Z., Zhang, Y., & Liao, X. (2013). Enzyme inactivation in food processing using high pressure carbon dioxide technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 145-161.
- 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, 1–25.
- Kang, J., & Song, K.B. (2018). Inhibitory effect of plant essential oil nanoemulsions against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* Typhimurium on red mustard leaves. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45, 447-454.
- Komaiko, J.S., & McClements, D.J. (2016). Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 331-352.
- Lee, J., Kim, S., & Kang, D. (2015). Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 83-88.

- Leite, C.J.B., Sousa, J.P., Medeiros, J.A.C., Conceição, M.L., Falcão-Silva, V.S., & Souza, E.L., (2016). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. essential oil in pineapple juice. *Journal of Food Protection*, 79, 213-219.
- Liang, R., Xu, S., Shoemaker, C.F., Li, Y., Zhang, F., & Huang, Q. (2012). Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7548–7555.
- Macwan, S.R., Dabhi, B.K., Aparnathi, K.D., & Prajapati, J.B. (2016). Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5, 885-901.
- McClements, D. J. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8, 1719-1729.
- 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, 205–14.
- Neves, M.F., Trombin, V.G., Lopes, F.F., Kalaki, R., & Milan, P. (2011). World consumption of fruit juices, nectars, and still drinks. In: M. F. Neves, & V. G. Trombin (Eds.), *The orange juice business: A Brazilian perspective* (pp. 119-119). The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Oliveira, A.E.M.F.M., Bezerra, D.C., Duarte, J.L., Cruz, R.A.S., Souto, R.N.P., Ferreira, R.M.A., Nogueira, J., Conceição, E.C., Leitão, S., Bizzo, H.R., Gama, P.E., Carvalho, J.C.T., & Fernandes, C.P. (2017). Essential oil from *Pterodon emarginatus* as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6, 1-9.
- Pagán, E., Berdejo, D., Espina, L., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2018). Antimicrobial activity of suspensions and nanoemulsions of citral in combination with heat or pulsed electric fields. *Letters in Applied Microbiology*, 66, 63-70.
- Pereira, A.C.S., Wurlitzer, N.J., Dionísio, A.P., Soares, M.V.L., Bastos, M.D.R., Alves, R.E., & Brasil, I.M. (2015). Synergistic, additive and antagonistic effects of fruit mixtures on total antioxidant capacities and bioactive compounds in tropical fruit Juices. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 65, 119-127.
- Petruzzi, L., Campaniello, D., Speranza, B., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Thermal treatments for fruit and vegetable Juices and beverages: a literature overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 668-691.

- Ragelle, H., Crauste-Manciet, S., Seguin, J., Brossard, D., Scherman, D., Arnaud, P., & Chabot, G.G. (2012). Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 427, 454-459.
- Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Modeling inactivation kinetics and occurrence of sublethal injury of a pulsed electric field-resistant strain of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium in media of different pH. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 290-298.
- Schelz, Z., Molnar, J., & Hohmann, J., (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77, 279-285.
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L, & Yuk, H. (2013). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 625-644.
- Sousa Guedes, J.P.S., Medeiros, J.A.C., Silva, R.S.S., Sousa, J.M.B., Conceição, M.L., & Souza, E.L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 183-192.
- Souza, E.L., Almeida, E.T.C., & Sousa Guedes, J.P. (2016). The potential of the incorporation of essential oils and their individual constituents to improve microbial safety in juices: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 753-772.
- Topuz, O.K., Özvural, E.B., Zhao, Q., Huang, Q., Chikindas, M., & Gölükçüd, M. (2016). Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food Chemistry*, 203, 117-123.
- Tyagi, A., Gottardi, D., Malik, A. & Guerzoni, M. E. (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through *in vitro* and *in vivo* (real fruit juices) assays. *Food Chemistry*, 137, 108-114.
- Wu, J., Lin, J., & Zhang, Q. (2014). Physical and antimicrobial characteristics of thyme oil emulsified with soluble soybean polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, 39, 144-150.
- Zhang, S.J., Zhang, M., Fang, Z.X. & Liu, Y.P. (2017). Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 316-322.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q., & Liang, H. (2014). Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, 150, 307-312.
- Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D.J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 6247-6255.

Table 1. Droplet size and polydispersity index (PDI) of nanoemulsions of *Mentha piperita* L. essential oil stored at 4 °C. Data represent the mean \pm standard deviation of the mean of at least three independent experiments.

| Storage time (months) | Droplet size (nm) | PDI |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 0 | 134 \pm 1 ^a | 0.322 \pm 0.009 ^a |
| 1 | 191 \pm 8 ^b | 0.299 \pm 0.005 ^a |
| 4 | 164 \pm 2 ^c | 0.243 \pm 0.017 ^b |

Different superscript letters in the same column indicate significant difference ($p \leq 0.05$), based on student t-test.

Figure captions

Figure 1. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157:H7 after exposure to n-MPEO at 5 μ L/mL for 80 min in mango juice at 35 °C. Bars correspond to freshly prepared nanoemulsions (black bars), and after 1st week (dark grey bars), 2nd week (light grey bars), 3th week (dotted bars), and 4th month (white bars) of storage at 4 °C. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments. The dotted line represents the detection limit.

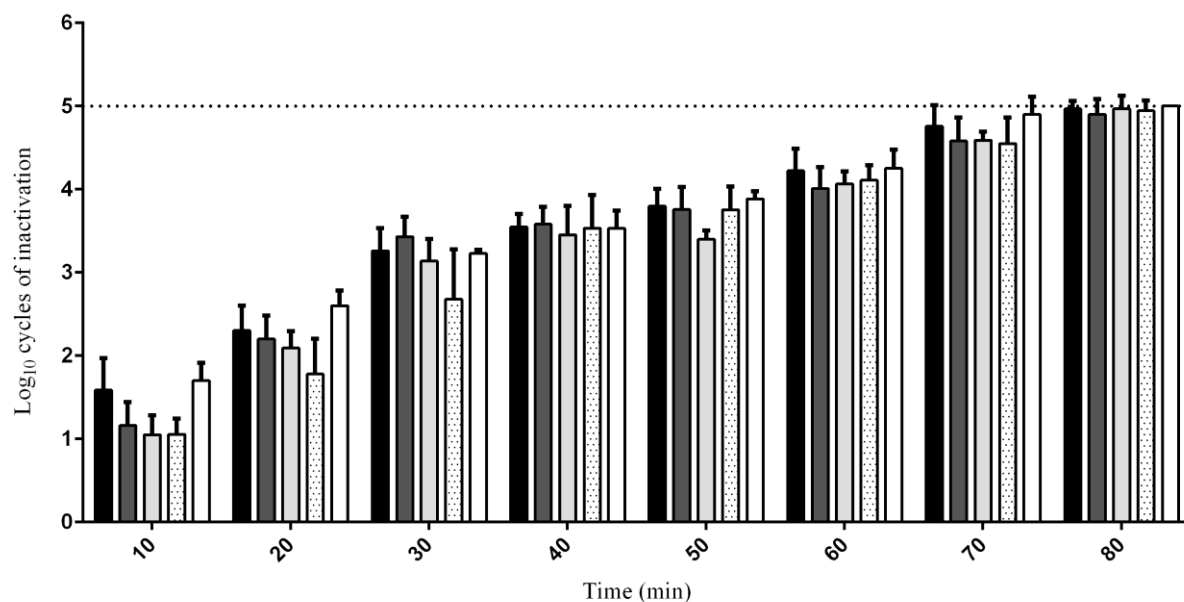


Figure 2. Survival curves of *E. coli* O157:H7 after exposure to s-MPEO (○) or n-MPEO (●) at 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 100 min in guava (A) and mango (B) juices at 35 °C. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments. The dotted line represents the detection limit.

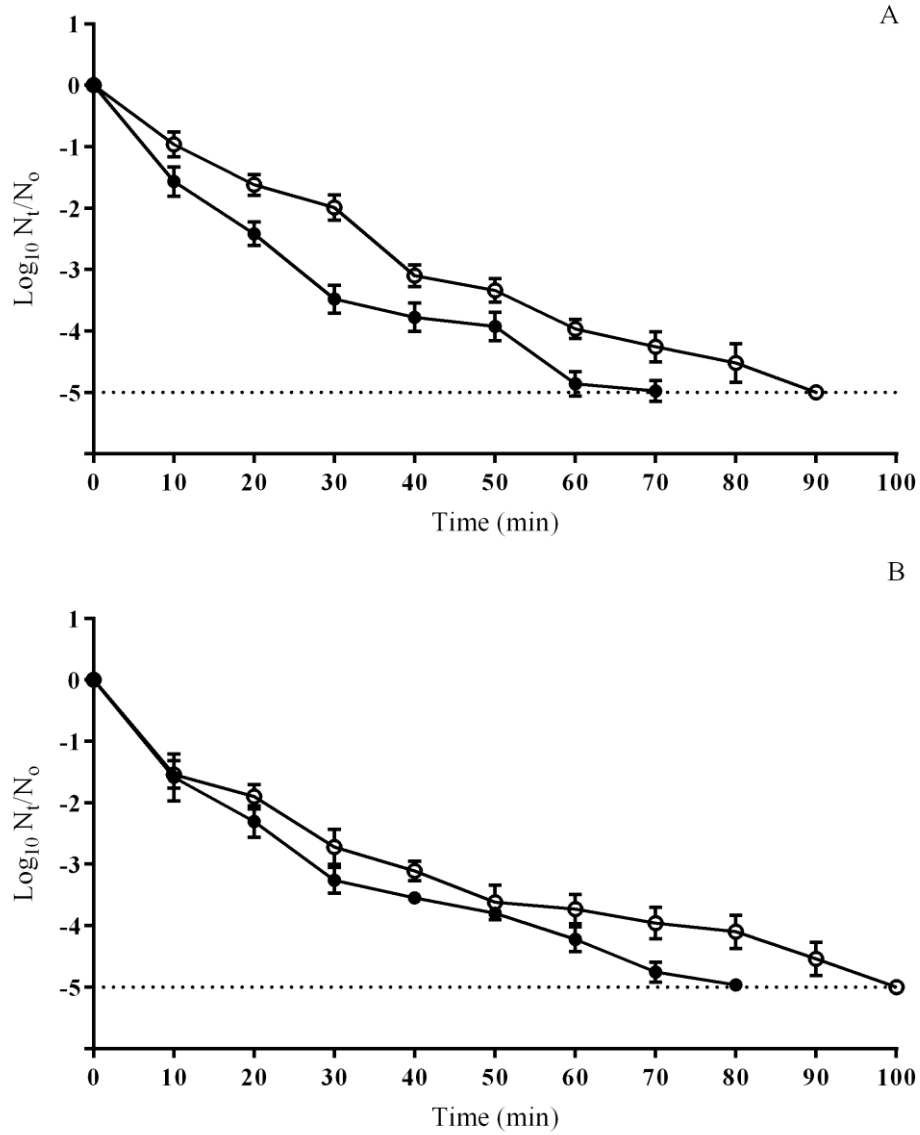


Figure 3. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157: H7 after a heat treatment for 10 min at 50 °C (A; D), 52 °C (B; E) and 54 °C (C; F) applied as a single agent (0.0; grey bars) or in combination with different concentrations (0.13, 0.31 and 0.63 μL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in the form of a nanoemulsion (white bars) or a suspension (black bars) in guava (A; B; C) and mango (D; E; F) juices. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments.

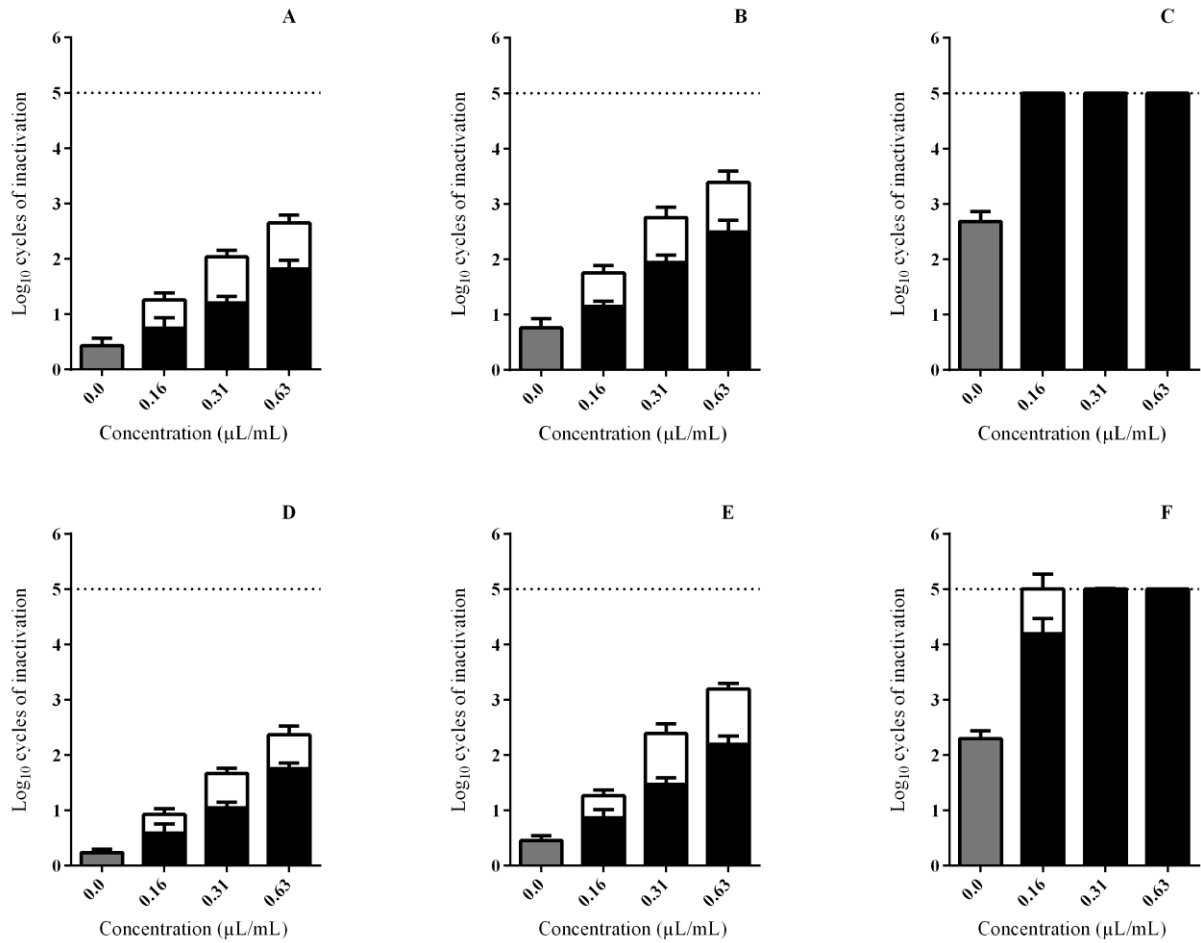


Figure 4. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157: H7 after a pulsed electric field treatment for 150 μs at 20 kV/cm (A; D), 25 kV/cm (B; E) and 30 kV/cm (C; F) applied as a single agent (0.0; grey bars) or in combination with different concentrations (0.13, 0.31 and 0.63 μL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in the form of a nanoemulsion (white bars) or a suspension (black bars) in guava (A; B; C) and mango (D; E; F) juices. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments.

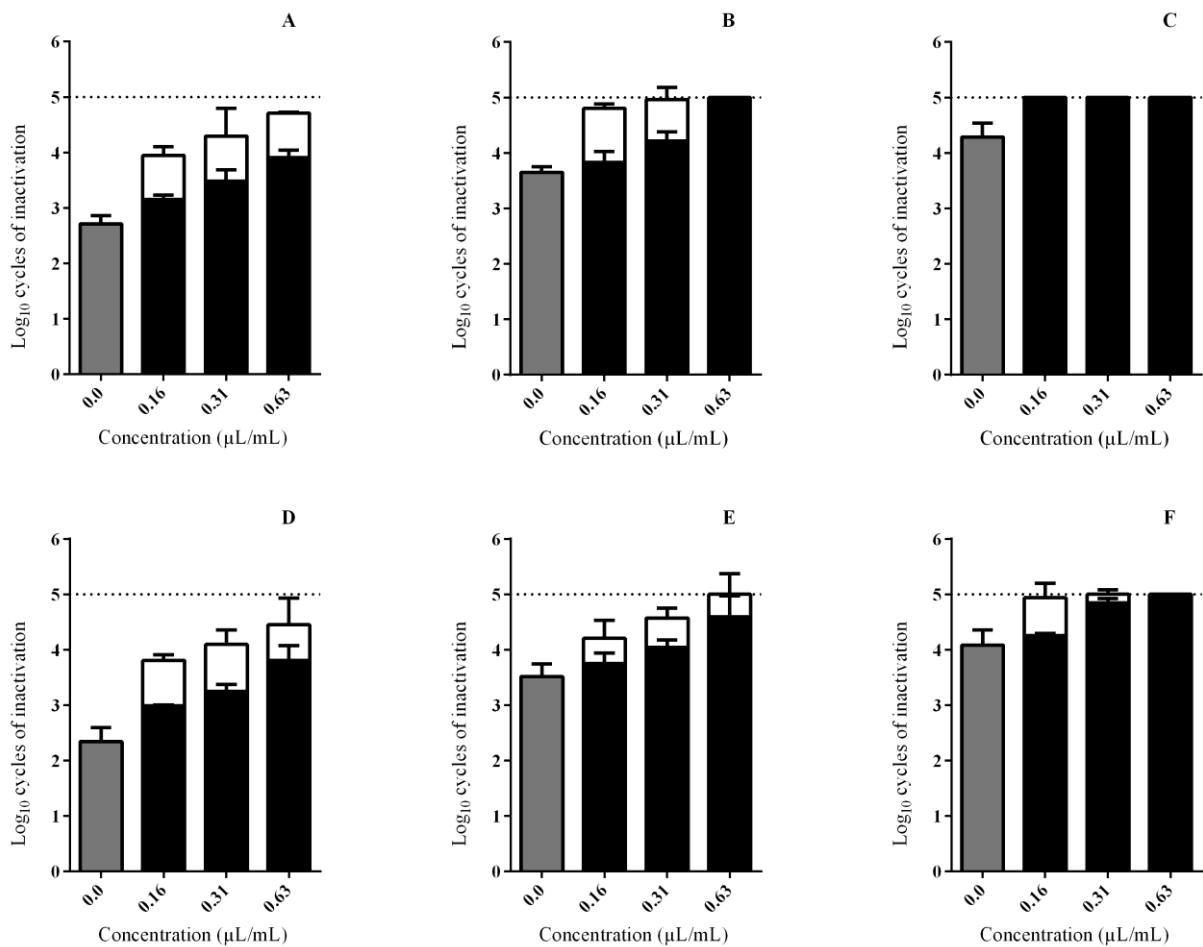
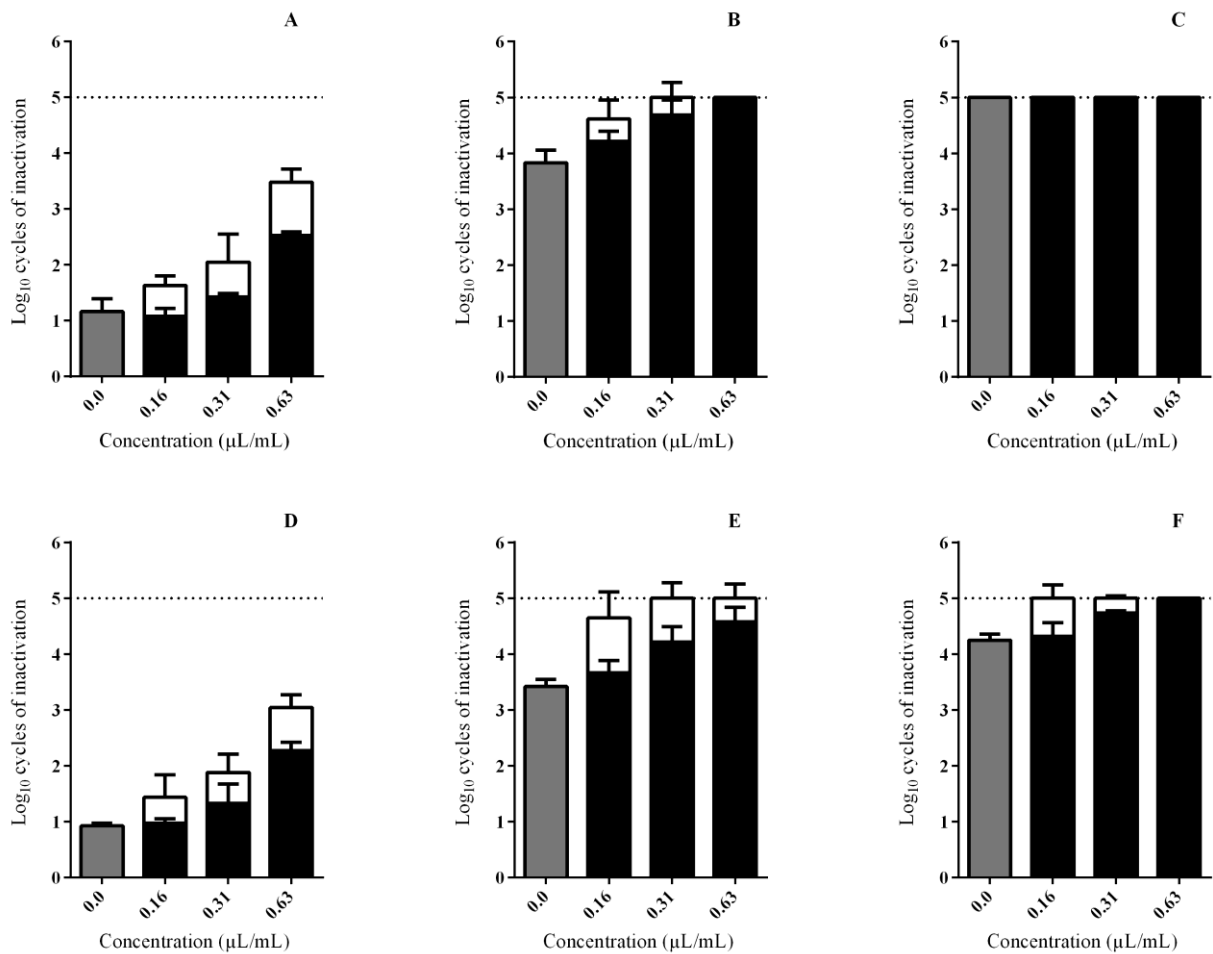


Figure 5. Log₁₀ cycles of inactivation of *E. coli* O157: H7 after a high hydrostatic pressure treatment for 15 min at 150 MPa (A; D), 200 MPa (B; E) and 300 MPa (C; F) applied as a single agent (0.0; grey bars) or in combination with different concentrations (0.13, 0.31 and 0.63 μL/mL) of *Mentha piperita* L. essential oil in the form of a nanoemulsion (white bars) or a suspension (black bars) in guava (A; B; C) and mango (D; E; F) juices. The error bars in the figures indicate the standard deviations of the means for data obtained from three independent experiments.



4.3 PATENTE: Combinado de óleo essencial de *Mentha piperita* L. e calor moderado para inibição de patógenos em sucos de fruta.

(Depositada; Número do Processo: BR 10 2018 010250 8)



21/05/2018 870180042146
11:40

29409161804991774

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 010250 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

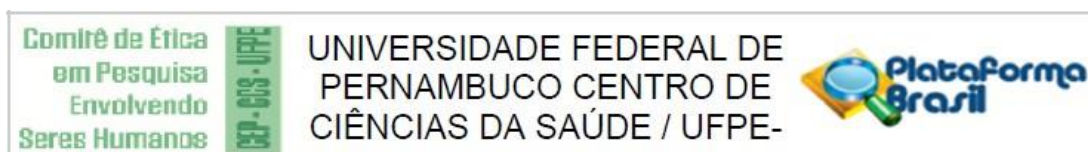
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo a explorar a eficácia de concentrações sensorialmente aceitas de OEMP para aplicação como agente único ou em combinação com tratamento térmico moderado, campo elétrico pulsado e alta pressão hidrostática em sucos de frutas tropicais. E, ainda, não há na literatura estudos que avaliem a eficácia do uso de nanoemulsões de OEMP isolado ou em combinação com outras tecnologias de conservação para garantir a segurança de sucos de frutas tropicais. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o uso de óleos essenciais em combinação com outras tecnologias de conservação de alimentos para conservar sucos de frutas é uma alternativa inovadora e potencialmente útil para substituir o uso de conservantes sintéticos e tratamentos térmicos intensos.

Pesquisas futuras devem ser realizadas para avaliar o potencial da aplicação combinada de OEMP, em suspensão ou nanoemulsão, e outras tecnologias de conservação para inibição da microbiota auctotone e de micro-organismos deteriorantes de sucos de frutas. A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pesquisas podem ser realizadas para determinar os limiares sensoriais de outros OEs em diferentes sucos de frutas, garantindo sua aplicação no alimento sem que haja rejeição por partes dos consumidores. Por fim, faz-se necessária a realização de uma análise de mercado e custo, para inferir sobre a viabilidade econômica dos processos combinados.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Jossana Pereira de Sousa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43653415.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.125.993

Data da Relatoria: 29/06/2015

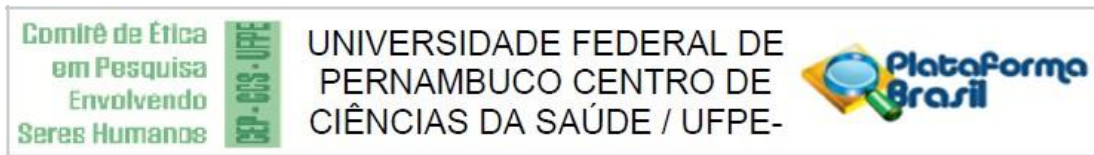
Apresentação do Projeto:

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

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

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

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



Continuação do Parecer: 1.125.993

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

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

Critério de Inclusão:

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

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

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

Critério de Exclusão:

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

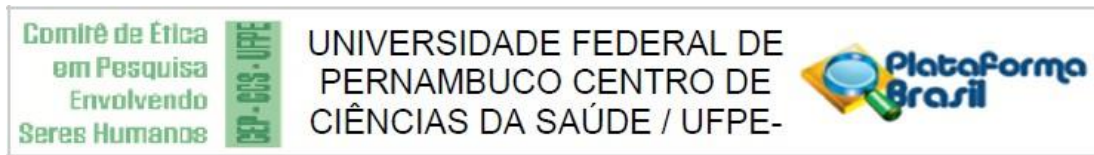
Objetivo da Pesquisa:

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

Objetivos específicos:

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

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



Continuação do Parecer: 1.125.993

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

sem comentários

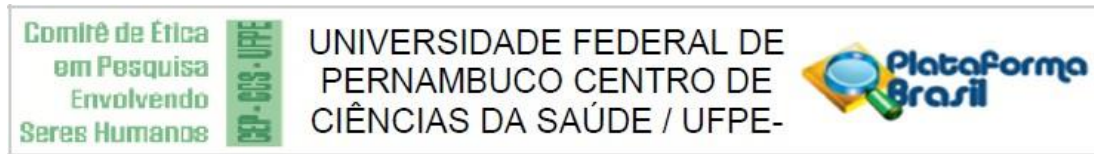
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os termos exigidos pela resolução 466/12

Recomendações:

Sem recomendações

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



Continuação do Parecer: 1.125.993

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

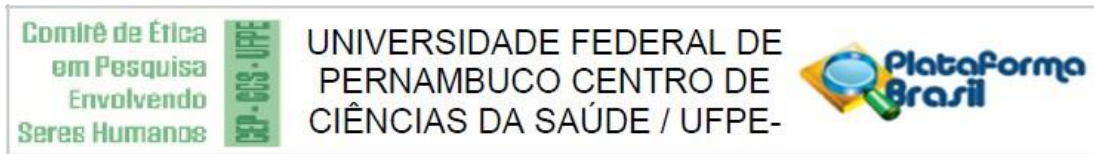
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação",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

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

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

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

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



Continuação do Parecer: 1.125.993

RECIFE, 26 de Junho de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

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

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIAS DE
ALIMENTOS****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Aplicação combinada de óleo essencial de *Mentha piperita* L. com tratamento térmico moderado ou tecnologias emergentes para a conservação de sucos de frutas, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Rayssa Julliane de Carvalho, Telefone: (83) 99921-1397 e Email: rayssa_ea_ufpb@hotmail.com para contato com o pesquisador responsável (inclusive ligações a cobrar), sob a orientação da Profa. Dra. Marciane Magnani, telefone para contato: (83) 3216-7576, e-mail: magnani@gmail.com.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do Estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos da aplicação combinada de óleos essenciais com tratamento térmico moderado, campo elétrico pulsado e alta pressão hidrostática para a conservação de sucos de frutas tropicais e busca informações sobre a conservação dos sucos de cajá, goiaba e manga, pelo uso do óleo essencial de *Mentha piperita* L., incluindo o impacto do seu uso na aceitação sensorial do produto.

Serão considerados critérios de exclusão: pessoas menores de 18 anos, indivíduos que não tenham o hábito de consumir sucos de frutas, tabagistas, dependentes de álcool e gestantes. O período de participação é de aproximadamente 10 minutos. Serão oferecidas amostras dos sucos de frutas (cajá, goiaba e manga) tratados para degustação e avaliação da aceitação global, com posterior preenchimento do formulário do Teste de Aceitação. Será também oferecido um copo com água, bolacha, uma caneta e formulário para o registro de sua opinião, em forma de escala de nove pontos, que irá do gostei muitíssimo ao desgostei muitíssimo. Após provar os sucos, os formulários serão devolvidos à equipe de pesquisadores e o Sr. (a) estará liberado (a) para suas atividades particulares.

O teste sensorial não apresenta riscos previsíveis ou mensuráveis, pois de acordo com a literatura os óleos essenciais de menta adicionados aos sucos de frutas não apresentam efeitos tóxicos significativos *in vivo* nas concentrações utilizadas no estudo. Inicialmente, será oferecida uma prova mínima, antes da degustação oficial, para verificar a sua aceitabilidade orgânica ao produto. Por ser considerado um alimento perecível, para controlar o fator

contaminação, todo o procedimento de elaboração dos sucos foi conduzido de acordo com as Boas Práticas de Fabricação, de acordo com as legislações vigentes. Além disto, antes da aplicação das análises sensoriais, as amostras foram submetidas a análises microbiológicas que demonstraram qualidade higiênico-sanitária dos produtos elaborados, garantindo que os provadores receberão amostras sem nenhum risco de contaminação microbiológica. Ainda, os participantes da pesquisa serão avisados de que há substâncias que possam causar alergia ou danos à saúde, e caso apresente alguma reação alérgica, não antes vivenciada, durante ou após o teste sensorial, comunique à equipe, que prontamente chamará o Serviço de Atendimento Móvel de Urgência – SAMU, por meio do número 192, assim como, na ausência deste, irá orientá-lo a ir ao hospital de referência mais próximo.

A condução deste plano de trabalho permitirá propor uma inovação tecnológica que pode ser incorporada na linha de produção de empresas de processamento de frutas, aumentando a diversidade de alimentos no mercado e sua competitividade na área de novos alimentos com valor agregado, além de gerar informações científicas sobre a potencialidade antimicrobiana de produtos naturais de possível uso em alimentos associados a tecnologias emergentes de conservação.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (notas atribuídas às amostras dos sucos de frutas) ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado pelo período mínimo de cinco (5) anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE C - Formulário para Análise Sensorial



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

TESTE DE ACEITAÇÃO DE SUCOS FRUTAS

Nome: _____ Data: ____/____/____

Sexo: () M () F E-mail: _____

Idade: () <18 () 18-25 () 25-35 () 35-45 () >45

Telefone: _____ Escolaridade: _____

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

Com que frequência você consome sucos de frutas?

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

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

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

| Atributo | Amostras | | | | | | | | | |
|------------------|----------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | | | | |
| Aceitação Global | | | | | | | | | | |

Obrigada!

ANEXOS

ANEXO A - Relatório técnico do óleo essencial de *Mentha piperita* L.
ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS
Óleo Essencial de Menta Piperita
(Mentha piperita)

CAS Number: 84082-70-2

| | Especificações |
|--------------------------------|---|
| Aparência | Líquido Límpido |
| Cor | Incolor a Amarelo Palha |
| Impurezas | Isento |
| Odor | Característico |
| Densidade (20°C) | 0,890 – 0,910 |
| Índice de Refração (20°C) | 1,450 – 1,470 |
| Rotação Ótica | [-30° ; -10°] |
| Principais componentes (aprox) | l-mentol= 32% mentona= 28% acetato de mentila= 5% eucaliptol= 5% |