



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE
MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch) EXPOSTO AO GÁS
OZÔNIO DURANTE O ARMAZENAMENTO**

HANNA ALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE
MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch) EXPOSTO AO GÁS
OZÔNIO DURANTE O ARMAZENAMENTO**

HANNA ALVES

ORIENTADOR: DR. ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

PUBLICAÇÃO: 127

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE
MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch) EXPOSTO AO GÁS
OZÔNIO DURANTE O ARMAZENAMENTO**

HANNA ALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.

APROVADO POR:

**ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR, Dr. UnB – FAV
(Orientador)**

**MÁRCIO DE CARVALHO PIRES, Dr. Professor UnB – FAV
(Examinador Interno)**

**MARCIO ANTONIO MENDONÇA, Dr. UnB – FAV
(Examinador Interno)**

BRASÍLIA/DF, 23 DE FEVEREIRO DE 2017.

FICHA CARTOGRÁFICA

Alves, Hanna

Qualidade microbiológica e físico-química de morango (*Fragaria x ananassa* duch) exposto ao gás ozônio durante o armazenamento

Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

1. Gás ozônio. 2. Morango. 3. Qualidade microbiológica 4. Qualidade físico-química.

Ernandes, R. A. Ph.D

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Hanna Alves

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Qualidade microbiológica e físico-química de morango (*fragaria x ananassa* duch) exposto ao gás ozônio durante o armazenamento

GRAU: Mestre

ANO: 2017

É concedida à Universidade de Brasília de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Nome: Hanna Alves

CPF: 035.801.361-51

Endereço: Avenida São Francisco – Lote 01 – Chácara II Irmãos – Ponte Alta Norte – Gama – DF.

CEP: 72.427-010

Telefone: (61) 98603-1089 / E-mail: hannaalves@hotmail.com

DEDICATÓRIA

Com todo amor, dedico aos meus pais que representam tudo que sou hoje.

Ao meu noivo pelo apoio, paciência e conselhos que me guiaram até aqui.

À minha irmã, cunhado, tios, tias, primos primas, amigos e avó que sei que estarão
sempre ao meu lado.

Em especial ao meu avô, que ano passado nos deixou em corpo, mas sei que sua alma
cuida de mim de onde estiver.

Para todos que tanto amo, dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por todas as graças recebidas.

Agradeço à Universidade de Brasília pela oportunidade de estudar em uma das melhores instituições do Brasil e do mundo. A CAPES pela bolsa de estudos, e ao CNPq e FAPDF pelo auxílio financeiro.

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais e minha irmã, que são meus primeiros amores, aqueles a quem devo tudo que sou.

Meu noivo que é o meu maior e melhor apoio. Sempre que balancei nessa jornada, foi ele quem me segurou para que eu não caísse.

Meus amigos queridos, que estão comigo em todos os momentos, sem vocês as comemorações não teriam a mesma graça.

Em especial, quero agradecer e homenagear meu avô que nos deixou no final do ano de 2016. Ele que é meu maior exemplo de força, honestidade e bondade. Muito obrigada por existir na minha vida. E é para o meu herói, Senhor Antônio, todas as minhas palmas.

EPÍGRAFE

É Proibido

É proibido chorar sem aprender,

Levantar-se um dia sem saber o que fazer

Ter medo de suas lembranças.

É proibido não rir dos problemas

Não lutar pelo que se quer,

Abandonar tudo por medo,

Não transformar sonhos em realidade.

É proibido não demonstrar amor

Fazer com que alguém pague por tuas dúvidas e mau-humor.

É proibido deixar os amigos

Não tentar compreender o que viveram juntos

Chamá-los somente quando necessita deles.

É proibido não ser você mesmo diante das pessoas,

Fingir que elas não te importam,

Ser gentil só para que se lembrem de você,

Esquecer aqueles que gostam de você.

É proibido não fazer as coisas por si mesmo,

Não crer em Deus e fazer seu destino,

Ter medo da vida e de seus compromissos,

Não viver cada dia como se fosse um último suspiro.

É proibido sentir saudades de alguém sem se alegrar,

Esquecer seus olhos, seu sorriso, só porque seus caminhos se desconstruíram,

Esquecer seu passado e pagá-lo com seu presente.

É proibido não tentar compreender as pessoas,

Pensar que as vidas deles valem mais que a sua,

Não saber que cada um tem seu caminho e sua sorte.

É proibido não criar sua história,

Deixar de dar graças a Deus por sua vida,

Não ter um momento para quem necessita de você,

Não compreender que o que a vida te dá, também te tira.

É proibido não buscar a felicidade,

Não viver sua vida com uma atitude positiva,

Não pensar que podemos ser melhores,

Não sentir que sem você este mundo não seria igual.

Alfredo Cuervo Barrero

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 MORANGO.....	4
2.2 SANITIZAÇÃO DE FRUTAS E HORTALIÇAS	5
2.3 O OZÔNIO	6
2.4 O OZÔNIO USADO NA FORMA GASOSA.....	10
2.5 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS FRUTOS.....	12
2.5.1 Microrganismos de interesse	13
2.5.1.1 Bactérias.....	15
2.5.1.2 Bolores e Leveduras.....	15
2.6 QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS	16
2.6.1 Perda de massa.....	17
2.6.2 Acidez Titulável	18
2.6.3 Sólidos Solúveis Totais	18
2.6.4 pH.....	18
2.6.5 Coloração dos frutos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 OBTENÇÃO DOS MORANGOS	20

3.2	OBTENÇÃO DO GÁS OZÔNIO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GÁS.....	21
3.3	OZONIZAÇÃO DOS FRUTOS	22
3.4	ANÁLISES DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS FRUTOS	23
3.4.1	Recepção e preparo das amostras	23
3.4.2	Preparo das diluições seriadas das amostras de morango.....	23
3.4.3	Contagem de bolores e leveduras	23
3.4.4	Contagem de Aeróbios Mesófilos	24
3.4.5	Detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	24
3.4.6	Contagem de coliformes totais e <i>E.coli</i>	25
3.5	ANÁLISES DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS	25
3.5.1	Perda de Massa	25
3.5.2	Acidez Total Titulável (ATT).....	25
3.5.3	Sólidos Solúveis Totais (SST).....	26
3.5.5	Relação entre Sólidos Solúveis Totais e Acidez Titulável (SST/AT)	26
3.5.6	Coloração dos frutos.....	26
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.	CONCLUSÕES	39
6.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frutos comprados diretamente do produtor	21
Figura 2. Gerador de ozônio Modelo O&L 3.0-O2 RM.....	22
Figura 3. Contagem de Bolors e Leveduras (log UFC g ⁻¹) em morangos ozonizados em diferentes concentrações do gás e armazenados por seis a 5 °C.	28
Figura 4. Contagem de Aeróbios Mesófilos (log UFC g ⁻¹) em morangos ozonizados em cinco diferentes concentrações do gás e armazenados por seis dias a 5 °C.	30
Figura 5. Perda de massa (%) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.....	33
Figura 6. Acidez total titulável (%) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.	34
Figura 7. Sólidos Solúveis Totais (°Brix) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.....	35
Figura 8. Curva de pH em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.	36
Figura 9. Relação SST/ATT em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.....	36
Figura 10. Tonalidade de cor (h°) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.....	37
Figura 11. Saturação de cor (croma) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.	37
Figura 12. Diferença de Cor em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do ozônio sobre a população microbiana.....	8
Tabela 2. Efeito do ozônio sobre os atributos de qualidade sensorial e nutricional nos alimentos.....	12
Tabela 3. Principais agentes microbiológicos que contaminam alimentos	14
Tabela 4. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de bolores e leveduras em morango, expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C	28
Tabela 5. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de aeróbios em morango, expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C.....	30
Tabela 6. Valores médios de perda de massa (PM), pH, sólidos solúveis totais (°Brix, SST), SST/ATT e a tonalidade de cor (h°) nos frutos submetidos a diferentes concentrações do ozônio, independentemente do período de armazenamento	32
Tabela 7. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à Acidez Titulável (%), expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C.....	34
Tabela 8. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à Diferença de cor, expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Aeróbios
AGEITEC	Agência Embrapa de Informação Tecnológica
AOAC	Association of Analytical Communities
ATT	Acidez Total Titulável
BAM	Bacteriological Analytical Manual
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
EC	Placas 3M™ Petrifilm™ para Contagem de <i>E.coli</i> e Coliformes
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
IAL	Instituto Adolfo Lutz
KI	Iodeto de Potássio
LAMAL	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
LIA	Ágar lisina ferro
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
O&L	Ozone & Life
O ₂	Gás oxigênio
O ₃	Gás ozônio
pH	Potencial Hidrogeniônico
SS	Sólidos Solúveis
SST	Sólidos Solúveis Totais
THM	Trihalometano
TSI	Tríplice açúcar ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
YM	Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Leveduras e Bolores

RESUMO

O morango se destaca por ser bastante consumido em todo o país, devido suas características apreciadas pelos consumidores, tais como sabor, cor, odor, textura e doçura. Seu uso é diverso, que vai desde o consumo *in natura*, até a fabricação de geleias, doces, polpas e iogurtes. Deve-se garantir a segurança do produto, no que se refere à qualidade física, química e microbiológica. Diversos sanitizantes são utilizados na indústria alimentícia, porém cada vez mais é preciso introduzir produtos que se adequem a nova realidade exigida pelo mercado. Tem-se buscado tecnologias que sejam sustentáveis, tendo em vista inclusive o impacto ao meio ambiente. O ozônio surge como uma alternativa aos sanitizantes tradicionais. Tem apresentado elevada capacidade de inativar microrganismos em função do seu alto poder oxidativo. Trata-se de um gás que não gera resíduos tóxicos nos alimentos e deve ser produzido no próprio local. Nesse contexto, é de suma importância o estudo do binômio concentração do gás e período de exposição para cada alimento, de forma que se consiga inativar os microrganismos indesejáveis, sem alterar significativamente as características físico-químicas dos alimentos. Então, o trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de morangos expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenados durante seis dias sob refrigeração (5°C). Os morangos da variedade “Portola” foram adquiridos diretamente do produtor. O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio baseado no método de Descarga por Barreira. Foram testadas concentrações equivalentes a 0, 4, 9, 14 e 18 mg L⁻¹, vazão de 1 L min⁻¹, na temperatura de 25 °C, por 30 min, com três repetições. No que tange a qualidade microbiológica, verificou-se a presença de *Salmonella* spp. e quantificaram-se coliformes totais, *E. coli*, bolores e leveduras e mesófilos aeróbios. Com relação à qualidade físico-química, analisou-se perda de massa; acidez total titulável; sólidos solúveis totais; pH; relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável; e coloração dos frutos. Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em Esquema Fatorial 5X4, sendo cinco tratamentos e quatro períodos de armazenamento (0, 2, 4 e 6 dias), com três repetições. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e *E. coli*, nos frutos submetidos ou não a ozonização. A baixa e irregular contagem de coliformes totais nos frutos não permitiu inferir sobre a capacidade do ozônio de inativar microrganismos desse grupo. O ozônio se mostrou eficiente no controle de bolores e de leveduras e de mesófilos aeróbios em morangos durante o armazenamento. Verificou-

se, imediatamente depois da ozonização, contagem de bolores e leveduras 3,5 ciclos log inferior, quando se comparou os resultados obtidos nos frutos ozonizados com aqueles relativos aos não ozonizados. Durante o armazenamento a contagem de bolores e leveduras nos frutos ozonizados permaneceu inferior à obtida nos não ozonizados. Tendência semelhante foi observada para mesófilos aeróbios. Imediatamente depois da ozonização, foi possível obter redução superior a 4,0 ciclos log na contagem de mesófilos aeróbios, quando se comparou com os resultados obtidos nos frutos não expostos ao gás. Em geral, nas condições adotadas no trabalho, o ozônio não afetou negativamente a qualidade físico-química dos morangos. Por outro lado, verificou-se menor perda de massa dos frutos ozonizados quanto maior a concentração de exposição ao gás, e maiores valores de sólidos solúveis totais e da relação entre sólidos solúveis totais e acidez total titulável quando se adotou a concentração de 4 mg L⁻¹, independentemente do período de armazenamento. Além disso, houve tendência de manutenção da acidez total titulável ao longo do armazenamento, na concentração do gás de 18 mg L⁻¹. No que se refere à diferença de cor, observou-se maior incremento à medida que se eleva a concentração do gás, ao longo do armazenamento. Concluiu-se que o ozônio é um importante agente antimicrobiano, e nas condições adotadas no trabalho provocou redução de microrganismos indesejáveis. O gás também não interferiu na maioria dos parâmetros físico-químicos avaliados. Vale salientar que é importante dar prosseguimento às pesquisas com o uso desse gás, de tal forma que o uso dessa tecnologia seja difundida na indústria de alimentos.

Palavras-chave: morango, gás ozônio, qualidade microbiológica, qualidade físico-química.

ABSTRACT

The strawberry stands out for being widely consumed throughout the country, due to its characteristics appreciated by consumers, such as flavor, color, odor, texture and sweetness. Its use is diverse, ranging from the consumption in natura, to the manufacture of jellies, sweets, pulps and yogurts. The safety of the product should be ensured with regard to physical, chemical and microbiological quality. Several sanitizers are used in the food industry, but more and more it is necessary to introduce products that adapt to the new reality demanded by the market. Technology has been sought that is sustainable, in view of even the impact on the environment. Ozone appears as an alternative to traditional sanitizers. It has presented high capacity of inactivating microorganisms due to its high oxidative power. It is a gas that does not generate toxic waste in food and must be produced locally. In this context, it is extremely important to study the binomial gas concentration and exposure period for each food, in order to inactivate the undesirable microorganisms without significantly altering the physical and chemical characteristics of the food. The objective of this work was to evaluate the microbiological and physico-chemical quality of strawberries exposed to the ozone gas in different concentrations and stored for six days under refrigeration (5 °C). Strawberries of the "Portola" variety were purchased directly from the producer. Ozone gas was obtained by means of an ozone generator based on the Barrier Discharge method. Concentrations equivalent to 0, 4, 9, 14 and 18 mg L⁻¹, flow rate of 1 L min⁻¹ were tested at 25 ° C for 30 min with three replicates. Regarding the microbiological quality, the presence of *Salmonella spp.* and total coliforms, *E. coli*, molds and yeasts and aerobic mesophiles were quantified. Regarding the physico-chemical quality, mass loss was analyzed; Titratable total acidity; Total soluble solids; PH; Total soluble solids ratio and titratable total acidity; And coloring of the fruits. A completely randomized design (DIC) was used in 5X4 Factorial Scheme, with five treatments and four storage periods (0, 2, 4 and 6 days), with three replications. No evidence of *Salmonella spp.* and *E. coli*, in fruits submitted or not to ozonization. The low and irregular count of total coliforms in the fruits did not allow to infer about the capacity of the ozone to inactivate microorganisms of this group. Ozone was efficient in the control of molds and yeasts and aerobic mesophiles in strawberries during storage. After the ozonation, ocher and yeast counts were 3.5 log lower cycles, comparing the results obtained in the ozonized fruits with those related to the non-ozonated fruits.

During storage, the counts of molds and yeasts in the ozonated fruits remained lower than those obtained in non - ozonated fruits. A similar trend was observed for aerobic mesophiles. Immediately after ozonization, it was possible to obtain a reduction of more than 4.0 log cycles in the count of aerobic mesophiles, when compared with the results obtained in fruits not exposed to the gas. In general, under the conditions adopted at work, ozone did not adversely affect the physical-chemical quality of strawberries. On the other hand, there was a lower loss of mass of the ozonated fruits when the concentration of exposure to the gas was higher and the values of total soluble solids and of the relation between total soluble solids and titratable total acidity were observed when the concentration of 4 mg L⁻¹, regardless of the storage period. In addition, there was a tendency to maintain the titratable total acidity along the storage, at the gas concentration of 18 mg L⁻¹. Regarding the color difference, a greater increase was observed as the concentration of the gas was increased throughout the storage. It was concluded that ozone is an important antimicrobial agent, and under the conditions adopted in the work caused reduction of undesirable microorganisms. Gas also did not interfere with most of the physicochemical parameters evaluated. It is worth noting that it is important to continue the research with the use of this gas, in such a way that the use of this technology is widespread in the food industry.

Keywords: strawberry, ozone gas, microbiological quality, physico-chemical quality.

1. INTRODUÇÃO

O morango é consumido em todo o país devido suas características apreciadas pelos consumidores, tais como sabor, cor, odor, textura e doçura. Seu uso é diverso, que vai desde o consumo *in natura*, até a fabricação de geleias, doces, polpas e iogurtes. Sua ampla distribuição deve-se ao fato do surgimento de cultivares adaptadas aos mais variados solos e climas. Trata-se de um produto destinado à sobremesa, na maioria das vezes, muito delicado, altamente perecível e de preço elevado (HENRIQUE e CEREDA, 1999).

O morango (*Fragaria* sp.) é uma planta herbácea, rasteira e perene da família Rosaceae, propagada por via vegetativa, através de estolhos. Em geral, a cultura para produção de frutos é renovada anualmente, mas existem casos em que a produção é utilizada por dois anos consecutivos, ou mais (FERLA et al., 2007). A parte comestível é um pseudo-fruto, originário do receptáculo floral que se torna carnoso e suculento. Seu cultivo é bastante desenvolvido em vários países do mundo, especialmente nos de clima temperado, mas devido as cultivares adaptadas, esse fruto também é bastante difundido nos países de clima tropical (FERLA et al., 2007).

A cultivar de morango conhecida como Portola é muito utilizada pelos produtores brasileiros. É de dia neutro, ou seja, seus frutos são insensíveis aos estímulos de fotoperíodo. Os morangos dessa cultivar são de boa qualidade com média de aproximadamente 32 g em cada fruto (ANTUNES, 2013).

Ressalta-se que a vida de prateleira do morango é limitada, entre 5 e 7 dias, devido especialmente à alta atividade microbiana e respiratória (AGUAYO et al., 2006; NASCIMENTO e SILVA, 2010). Outro aspecto relevante, é que o morango esteve associado a surtos de hepatite A, além de contaminação por Norovírus, *Cyclospora cayatanensis* e *Staphylococcus aureus* (NOTERMANS et al., 2004; SIVAPALASINGAM et al., 2004). Sua fragilidade demanda cuidados na colheita, manuseio, armazenamento, transporte, processamento e comercialização, devido aos danos mecânicos, microbiológicos e fisiológicos que podem comprometer a qualidade do fruto (PONCE et al., 2010).

Diversos sanitizantes são utilizados na indústria alimentícia para frutas e hortalças, porém cada vez mais é preciso introduzir produtos que se adequem a nova realidade exigida pelo mercado. Além de exigir um alimento seguro que não prejudique

sua saúde, o mercado consumidor busca produtos que sejam sustentáveis ao meio ambiente, e essa consciência vêm crescendo constantemente.

Dentre os sanitizantes mais utilizados na indústria de alimentos para fins de higienização, incluem-se os compostos clorados. Todavia, estes produtos vêm sofrendo restrições quanto à sua utilização, devido à formação de subprodutos altamente tóxicos e cancerígenos como os compostos organoclorados, trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos, quando aplicados em materiais orgânicos. Dentre outras preocupações, o aumento da temperatura da água de lavagem durante a sanitização possibilita a liberação do cloro gasoso (Cl_2), que é tóxico. Além disso, o cloro é considerado corrosivo para alguns materiais constituintes dos equipamentos, mas por outro lado, esporos bacterianos e oocistos de protozoários demonstram alguma resistência ao ataque do cloro (COELHO et al., 2015). Nesse cenário, são necessários estudos com o objetivo de propor novos métodos de sanitização de alimentos. Uma das técnicas que vem sendo estudada na conservação de produtos de origem animal e vegetal é a ozonização.

O ozônio é um produto seguro, apresenta elevada capacidade de decomposição, não gerando resíduos tóxicos, e é um potente agente antimicrobiano. O gás ozônio (O_3), ou oxigênio triatômico, é uma forma alotrópica do oxigênio, que pode ser produzida naturalmente como resultado de relâmpagos ou radiação ultravioleta, ou produzido artificialmente (KIM et al., 1999a). Sinteticamente, o gás ozônio pode ser gerado pelo método de descarga por efeito corona. Durante a geração do ozônio, moléculas de oxigênio (O_2) são dissociadas, produzindo radicais livres altamente reativos, que reagem com outras moléculas de oxigênio, formando o O_3 (NOVAK e YUAN, 2007). O ozônio é um potente agente oxidante e sua utilização na agricultura se torna atraente pelo fato de poder ser gerado no próprio local de aplicação e o produto de sua degradação é o oxigênio (O_2) (MENDEZ et al., 2003). Outro importante aspecto a ser mencionado é que o ozônio foi classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos, é liberado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em alimentos, tanto na forma gasosa, quanto dissolvido em água, como agente antimicrobiano (FDA, 2001).

O gás ozônio surge como uma alternativa de sanitizante sustentável, que mostra-se potencialmente importante para a indústria de alimentos. É um forte agente antimicrobiano, desintoxicante e com potencialidade de eliminar resíduos de agrotóxicos, tem alta reatividade e decomposição espontânea em produtos não tóxicos. Pode ser aplicado em alimentos nas formas gasosa e dissolvido em água (TIWARI et

al., 2008; TIWARI et al., 2010). O ozônio na forma gasosa é utilizado com o gás diretamente em contato com o produto, e quando dissolvido em água, na forma de imersão em água ozonizada. O gás é adequado para descontaminar produtos alimentícios como frutas e hortaliças, equipamentos industriais, ambientes, superfícies que entram em contato com alimentos, tratar água e efluentes, entre outros (KIM et al., 1999b; KHADRE e YOUSEF, 2001; KHADRE et al., 2001; DHILLON et al., 2009). Normalmente, são necessárias baixas concentrações de ozônio e curto tempo de contato para inativar bactérias, fungos, leveduras, parasitas e vírus, porém a suscetibilidade dos microrganismos a esse gás varia com o estado fisiológico da cultura, pH do meio, temperatura, teor de água, carga orgânica, presença de aditivos, entre outros fatores (KHADRE et al., 2001; PUJA e FLORIAN, 2004; SUSLOW, 2004; STUCKI et al., 2005; PASCUAL et al., 2007; YUK et al., 2007; AKBAS e OZDEMIR, 2008; SELMA et al., 2008).

Devem-se ter alguns cuidados na utilização do ozônio, pois ele se torna um gás tóxico acima de certas concentrações, e limites máximos de exposição devem ser definidos e obedecidos pelas pessoas que trabalham em plantas de ozonização, elas devem ser submetidas a revisões médicas regulares (LANGLAIS et al., 1991). O ozônio não pode ser considerado universalmente benéfico aos alimentos, pois em altas concentrações, pode promover a rancificação oxidativa, alterando o sabor e a coloração do produto alimentício. As alterações nos atributos sensoriais e físico-químicos dependem da composição química do alimento, da dosagem de ozônio, e das condições do tratamento, do tempo de exposição, e são esses parâmetros que devem ser elucidados nas pesquisas com esse gás (KIM et al., 1999a). Devido a instabilidade do ozônio, o que impede sua armazenagem, torna-se necessário sua geração no próprio local de uso. O processo de produção de ozônio mais utilizado pela indústria é de descarga por efeito corona, sendo atualmente o mais utilizado em praticamente todos os ozonizadores disponíveis comercialmente.

Apesar dos vários trabalhos existentes com o uso do ozônio como agente de conservação de frutas e hortaliças, ainda há muito que se pesquisar para encontrar a melhor combinação tempo de exposição e concentração desse gás, para que se consiga inativar os microrganismos indesejáveis sem afetar a qualidade físico-química do produto. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de morangos ozonizados em diferentes concentrações do gás e armazenados durante seis dias em refrigeração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MORANGO

A classificação botânica define o morango como sendo a única hortaliça pertencente da família *Rosaceae*, ao gênero *Fragaria* e a espécie *Fragaria x ananassa Duch ex Rozier*, resultado do cruzamento entre as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana* (SILVA et al., 2007).

O morango é consumido em todo mundo, na maioria das vezes na forma *in natura*, muito susceptível à contaminação, e um fator limitante na sua comercialização é garantir um eficiente manejo fitossanitário nas diferentes etapas de cultivo. Por esses motivos que são importantes estudos na fase de pós-colheita com foco em boas práticas de conservação para aumentar a vida de prateleira, e que não comprometam a qualidade físico-química dos frutos, e sejam seguros do ponto de vista microbiológico (CAJAMARCA, 2015).

A produção de morango (*Fragaria x ananassa Duch.*) no Brasil encontra-se em franca expansão. A introdução de novas cultivares com menor sensibilidade ao fotoperíodo e a temperaturas baixas para frutificação, ou mais rústicas e com maior durabilidade pós-colheita, permitiu que o cultivo se expandisse e se popularizasse (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012).

Os frutos do morangueiro são atrativos para o consumidor, por apresentar características próprias, tais, como cor, o brilho, sabor, textura e odor (HENRIQUES et al., 2004). Os frutos também se destacam por serem importantes fontes de compostos bioativos, tais como vitamina C, folato e compostos fenólicos (FRANCO, 2002; PROTEGGENTE et al., 2002; GIAMPIERI et al., 2012). Outras vitaminas também são encontradas no morango, tais como tiamina, riboflavina, niacina, vitamina B6, vitamina K, vitamina A e vitamina E. Destaca-se que os compostos bioativos encontrados no morango estão associados a propriedades, tais como: ação antioxidante, capacidade de reduzir a suscetibilidade a infecções, efeito diurético e atividade anti-inflamatória em reumatismo e gota (ROCHA et al., 2008).

Em 2012, os dados publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mostraram que foram detectados cinco diferentes tipos de resíduos de ingredientes ativos irregulares no cultivo de morango (ANVISA, 2012). Tal fato tem provocado demanda crescente por produtos com qualidade higiênico-sanitária satisfatória aos consumidores que optam por produtos inócuos, nutritivos e isentos de

agrotóxicos. Sendo o morango um produto consumido na maioria das vezes *in natura*, faz-se necessário encontrar estratégias que causem menos danos ao produto, e a saúde humana e ambiental durante a sanitização do fruto.

O morango é apreciado em todo mundo devido suas características como sabor, odor, textura e doçura. Existem várias cultivares desse fruto que são utilizadas em diversos sistemas de cultivo no Brasil. Uma importante cultivar é conhecida como “Portola”. Essa cultivar é considerada própria para consumo *in natura* e é o resultado do cruzamento das cultivares *Camino Real x Ventana*. Seu fruto é grande, de peso médio 30,2 g; forma cônica curta; as plantas tem alto rendimento; é moderadamente resistente a oídio, antracnose, podridão da coroa e murcha de *Verticillium alboatrum*, porém, moderadamente suscetível à *Phytophthora fragariae* e *Phytophthora cactorum*, da podridão da coroa, e da mancha comum; tolerância condicional ao ácaro rajado, e responde bem ao plantio mais cedo; é uma cultivar de dias neutros (AGEITEC, 2017). Carvalho et al., (2012) concluíram que a cultivar Portola possui qualidade superior às outras cultivares que foram avaliadas no seu experimento, por apresentar boa concentração de sólidos solúveis, teor de acidez desejável (abaixo de 0,8%), ótima relação SS (sólidos solúveis) /AT (acidez titulável) e coloração vermelha mais intensa. Antunes (2013) avaliou seis cultivares de morango e verificou que a cultivar Portola se destaca pelo teor de minerais e vitamina C.

2.2 SANITIZAÇÃO DE FRUTAS E HORTALIÇAS

A etapa de sanitização é de suma importância para a qualidade de frutas e hortaliças, que são, na maioria das vezes, consumidas *in natura*. Tem como objetivo a eliminação de microrganismos patogênicos e reduzir a níveis seguros os deteriorantes, além da manutenção da sua qualidade durante o armazenamento. Além de uma atividade microbicida eficaz, é extremamente importante que o sanitizante seja seguro ao consumidor, do ponto de vista toxicológico e não altere a qualidade do alimento.

Dentre os sanitizantes mais usados na indústria de alimentos para fins de higienização, incluem-se os compostos clorados. Todavia, estes produtos vêm sofrendo restrições quanto à sua utilização, devido à formação de subprodutos altamente tóxicos e cancerígenos como os compostos organoclorados, trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos, quando aplicados em materiais orgânicos. Dentre outras preocupações, o

aumento da temperatura da água de lavagem durante a sanitização possibilita a liberação do cloro gasoso (Cl_2), que é tóxico. Além disso, o cloro é considerado corrosivo para alguns materiais constituintes dos equipamentos, e ainda, esporos bacterianos e oocistos de protozoários demonstram alguma resistência ao efeito do cloro (COELHO et al., 2015).

Nesse contexto, o ozônio tem sido apresentado como alternativa aos agentes antimicrobianos tradicionais. Suas principais características são o elevado potencial oxidativo, não gera resíduos tóxicos e contaminantes no alimento, é produzido no local de utilização, e é de fácil obtenção. Portanto o ozônio torna-se uma alternativa segura para os alimentos e para os consumidores, necessitando de estudos para adequar essa tecnologia em escala industrial, e na possível substituição do cloro por esse gás.

2.3 O OZÔNIO

O ozônio (O_3), descoberto em 1839 por Schönbein, é a forma triatômica do oxigênio. É um gás instável, solúvel em água (treze vezes mais do que o oxigênio, em temperaturas de 0 a 30 °C) e de odor pungente (frescor), que é formado pela excitação do oxigênio molecular a oxigênio atômico em um ambiente energizado, no qual ocorre a recombinação com outras moléculas de oxigênio (RICE, 1996). O ozônio foi utilizado, pela primeira vez, como agente conservante de alimentos em 1909, em câmaras frias de estocagem de carnes. Entretanto, naquela época sua utilização como desinfetante não atingiu maiores proporções na indústria de alimentos devida principalmente ao seu custo em relação a outras substâncias como, por exemplo, o cloro (CHIATTONE et al., 2008).

O processo mais utilizado para a geração de ozônio a nível industrial é o método de descarga por efeito corona, sendo o mais difundido e empregado comercialmente. O ozônio é gerado pela passagem de oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada carga elétrica (aproximadamente 10.000 V), ocasionando a dissociação do oxigênio. A recombinação de radicais livres de oxigênio, com moléculas de oxigênio presentes no sistema, origina o ozônio (METCALF e EDDY, 1991). Essa facilidade de obtenção concede ao ozônio a grande vantagem de ser produzido no próprio local de consumo, evitando custos com transporte, armazenamento, e com isso preservando o meio ambiente e economizando recursos financeiros.

As propriedades virucidas e bactericidas do ozônio foram usadas na 1ª Guerra Mundial, quando o ozônio era aplicado topicamente para desinfetar ferimentos e queimaduras de gás mostarda (BOCCI, 2004). Dessa forma, esta substância apresenta alta capacidade desinfetante e sanificante, amplo espectro de ação, atuando sobre bactérias, vírus, fungos filamentosos e leveduras, e sobre formas esporuladas (TORRES et al., 1996). Além disso, ele não altera as características organolépticas da água e dos alimentos, em condições adequadas, e não deixa resíduos tóxicos ou carcinogênicos nos mesmos, quando concentrações adequadas são utilizadas. A utilização do ozônio em processamento de alimentos foi aprovada pelo Food and Drug Association (FDA), sendo recomendada e considerada segura para utilização em tratamento, estocagem e processamento de produtos alimentícios.

Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) classificou o ozônio como um produto GRAS (seguro para o uso), e esse gás tem sido utilizado em outros países como no Canadá, Japão e Europa. No Brasil, a portaria da ANVISA n. 25/76 publicada no Diário Oficial da União em 09/11/1977, regulamenta o uso do ozônio (GIORDANO, 2009). Há evidências da eficácia do processo de ozonização, como operação unitária única tanto na forma gasosa, como na forma de água ozonizada, ou associada a outras técnicas sanitizantes, para o controle de diversas espécies de fungos e outros microrganismos, das quais se destacam a combinação da ozonização com a termoterapia.

Quando comparado a outros agentes oxidantes, como o cloro, o ozônio destaca-se pelo elevado potencial de oxidação (2,07 mV), sendo o segundo mais poderoso agente oxidante, com potencial inferior apenas ao flúor (3,06 mV), e o maior potencial oxidativo utilizado pela indústria de processamento de alimentos (GUZELSEYDIM et al., 2004; SILVA et al., 2011). Os produtos oriundos da sua decomposição agem potencializando seu efeito oxidante, assim, aliado ao seu alto potencial de oxidação, contribui para torná-lo eficaz contra inúmeras espécies de microrganismos patogênicos e deteriorantes a baixas concentrações e tempo de contato reduzido quando comparado aos sanitizantes utilizados comercialmente. Consequentemente, a redução no tempo de sanitização torna este processo um atrativo para as indústrias processadoras e casas de embalagem que buscam otimizar o tempo na linha de produção, tendo em vista uma maior produtividade (COELHO et al, 2015).

No entanto, a utilização do ozônio em alimentos deve ser feita com cautela, pois, em concentrações altas, a qualidade nutricional e sensorial pode ser afetada

podendo afetar o sabor e a coloração do produto (COELHO et al, 2015). Além disso, o ozônio em altas concentrações e grande tempo de exposição ainda pode ser tóxico para os seres humanos e afetar na qualidade do produto que ficar em contato com o gás. Todavia, tais alterações dependem da composição química do alimento e da concentração do gás e do tempo de exposição, por exemplo. Em vista disso, é de suma importância a avaliação do efeito na qualidade do produto em diferentes combinações de concentração e período de exposição ao gás, de tal forma que o processo seja otimizado para que seja utilizado comercialmente e em escala industrial.

Encontram-se, na literatura, diversos relatos que descrevem o efeito do ozônio sobre microrganismos. Costa (2012), em trabalho que objetivou avaliar o efeito fungicida do ozônio em mamão concluiu que a concentração de ozônio dissolvido em água em concentração e tempo adequados são eficientes na diminuição da severidade de antracnose na pós-colheita deste fruto, sem afetar na sua qualidade. Selma et al. (2007), avaliaram a eficiência da aplicação de ozônio na inativação de *Shigella sonnei* em alface, sendo que para 1 min de contato a 1,6 e 2,2 ppm de ozônio, a população de *S. sonnei* inoculada em água diminuiu 3,7 e 5,6 log UFC ml⁻¹, respectivamente. Na Tabela 1 são apresentados outros trabalhos realizados nos quais foi avaliado o efeito do ozônio na inativação de microrganismos.

Tabela 1. Efeito do ozônio sobre a população microbiana

ALIMENTOS	FORMA DE APLICAÇÃO DO OZÔNIO	POPULAÇÃO MICROBIANA ALVO	REFERÊNCIAS
Pêssegos	Gasoso, por 4 semanas, armazenado à 5 °C	Redução do crescimento de micélio e esporulação de fungos.	Palou et al. (2002)
Morango	Gasoso, armazenados por 3 dias a 2°C.	Redução da incidência de podridões por <i>Botrytis cinerea</i> .	Nadas et al. (2003)
Uva de mesa	Gasoso, por 1 ou 2 horas.	Redução da contaminação por <i>Botrytis cinerea</i> .	Mlikota-Glaber et al. 2010
Tomates fatiados	Aquoso, armazenados a 5 °C.	Redução da contagem microbiana.	Aguayou et al. (2014)
Banana	Imersão aquosa por 10 minutos.	Redução da contagem microbiana.	Alencar et al. (2013)
Mamão	Gasoso, por 10, 20 e 30 minutos.	Redução da contagem microbiana.	Yeoh et al. (2014)

FONTE: COELHO et al., 2015, adaptado de FREITAS-SILVA et al. (2013).

Apesar de serem encontrados na literatura diversos relatos sobre a ozonização como tecnologia na preservação de alimentos, há poucos no Brasil com aplicação em morangos, no qual se avalia o efeito do gás ozônio na manutenção da qualidade dos frutos. No estudo realizado por Ponce et al., (2010), avaliou-se a qualidade físico-química e microbiológica de morangos tratados com gás ozônio. Entretanto foi avaliada somente com uma combinação de concentração do gás e período de ozonização. A concentração adotada foi de 50 ppm com período de exposição de 60 minutos. Por esse motivo, é vista a necessidade de se estudar diferentes combinações de tempo de exposição e concentração do gás para cada alimento especificamente, além de avaliar seus efeitos durante o armazenamento, e sua interferência na conservação desses produtos alimentícios.

O uso seguro do ozônio é de fundamental importância para aplicação e operação na indústria alimentícia sendo que se tornam indispensáveis os sistemas de detecção e de eliminação de residuais no ambiente de trabalho. Como o ozônio acima de certas concentrações se torna um gás tóxico para o ser humano, limites máximos de exposição são definidos e precisam ser obedecidos, além disso, devem ser tomados os cuidados necessários durante o seu uso. As pessoas que trabalham em plantas de ozonização tem que ser submetidas a revisões médicas regulares. Em baixas concentrações o ozônio não provoca sinais de toxicidade, mas em altas concentrações pode ser fatal aos homens (CHIATTONE et al., 2008). Por esses constantes perigos relacionados ao manuseio do gás ozônio, o cuidado operacional e ocupacional deve ser sempre obedecido por empresas e pessoas que utilizarem esse gás.

Vários pesquisadores avaliaram tratamento pós-colheita em frutas e hortaliças com ozônio. Puia et al. (2004) que constataram a redução de incidência de doenças em maçãs armazenadas, com a aplicação de 25 ppm de Ozônio com variação de 0,5 a 1,5 horas. Salvador et al. (2006) comparou amostras de caquis tratados ou não com ozônio, e constatou que os frutos ozonizados permaneceram adequados para comercialização por um período de 35 dias, enquanto que os do grupo de controle apenas 16 dias. Bialka e Demirce (2007) afirmaram que o ozônio pode ser utilizado como agente bactericida no tratamento pós-colheita de morangos e framboesas. Tem-se ainda, que o ozônio pode ser utilizado, de acordo com Palou et al. (2001), para redução da concentração do etileno em transporte frutas. Para Ávila (2015), o ozônio pode ser útil na eliminação de resíduos de inseticidas. Em estudos realizados por Selma et al. (2007), concluiu-se que o tratamento com ozônio gasoso reduziu de forma eficiente a população inicial de

bactérias aeróbias mesófilas, e que pode ser adotado em substituição à lavagem em água e à sanitização com solução de clorado orgânico. Para Cristianini et al (2015), o processo de sanitização de alfaces com água ozonizada foi capaz de promover reduções decimais de até 4,5 ciclos logarítmicos na população *E. coli* O157:H7 e concluiu-se no estudo que a utilização de água ozonizada é uma tecnologia promissora e uma alternativa interessante aos sanitizantes tradicionais devido à sua eficiência em baixas concentrações em um curto período de tempo. Em pesquisa de Simões (2012), goiabas ozonizadas apresentaram menor incidência e menor nota de severidade a doenças da goiabeira quando comparados aos frutos não ozonizados. Esse autor concluiu que o ozônio gasoso é uma alternativa no controle de antracnose.

Em vista do exposto, fazem-se necessários estudos com o ozônio em que se adotem diferentes combinações de concentração do gás e período de ozonização, e que se testem também as diferentes formas de ozonização, como com o gás ozônio e a água ozonizada, e seus efeitos durante o armazenamento do fruto. Além disso, é importante que seja estudada a viabilidade do uso do gás ozônio na conservação dos frutos em diferentes condições. Dessa forma, será possível indicar combinação de concentração e período de exposição que seja mais eficaz na manutenção da qualidade físico-química e microbiológica do produto.

2.4 O OZÔNIO USADO NA FORMA GASOSA

O ozônio pode ser utilizado para vários fins, como na descontaminação de alimentos, na detoxificação de micotoxinas, no tratamento de água, na redução de resíduos de agrotóxicos usados nas lavouras, e no aumento do tempo de vida de alimentos (KIM et al, 1999b). O ozônio pode ser empregado nos alimentos na forma gasosa, ou dissolvido em água, na forma de água ozonizada. O gás ozônio apresenta maior estabilidade quando em fase gasosa e de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, sua meia-vida no ar atmosférico é da ordem de 12 h (RICE et al., 1981; GRAHAM, 1997; RUSSEL et al., 1999; DI BERNARDO & DANTAS, 2005).

O ozônio gasoso é um forte agente sanitizante e fumigante, tem várias utilizações na conservação dos alimentos, como a desinfestação, e desintoxicação do produto. O gás ozônio pode eliminar aromas indesejáveis produzidos por bactérias, e

também remover o hormônio etileno, responsável pela maturação de senescência de frutas. Essas vantagens do ozônio gasoso aumentam o tempo de conservação dos alimentos, e otimizam a sua distribuição (AOQUI, 2009).

Estudos utilizando o ozônio gasoso como agente fungicida para preservar a cevada e o trigo armazenados mostraram que, esse pode ser utilizado na inativação de fungos sem danificar a capacidade de germinação de ambos, o que faz do ozônio uma alternativa para vários tipos de gêneros alimentícios (ALLEN et al., 2003; WU et al., 2006). Santos (2014) testou ozônio gasoso em arroz, e os resultados confirmaram o efeito fungicida do gás ozônio nos grãos. A aplicação de gás ozônio em grãos é promissora tendo em vista a manutenção da qualidade e a segurança dos produtos, podendo atuar na degradação de sintetizados por fungos, as micotoxinas (SAVI et al., 2014) e na remoção de resíduos de agrotóxicos em frutas e vegetais (IKEURA et al., 2013).

Em pesquisa realizada por Simões (2012) com ozônio gasoso na conservação de goiabas, mostrou que a ozonização não afetou na qualidade dos frutos para os parâmetros que foram avaliados à exceção da vitamina C, e concluiu que o ozônio utilizado na forma gasosa é um processo em expansão no tratamento pós-colheita de frutas e hortaliças. Na Tabela 2, são apresentados alguns resultados de pesquisas nas quais foram avaliados os efeitos do ozônio na qualidade de frutas e hortaliças.

Tabela 2. Efeito do ozônio sobre os atributos de qualidade sensorial e nutricional nos alimentos.

ALIMENTOS	FORMA DE APLICAÇÃO DO OZÔNIO	ATRIBUTOS DE QUALIDADE SENSORIAL E NUTRICIONAL	REFERÊNCIAS
Pêssegos	Gasoso, por 4 semanas, armazenado à 5°C	Aumento da perda de água após 5 semanas de armazenagem; nenhuma alteração na respiração e nas taxas de produção de etileno, sem lesões fitotóxicas.	Palou et al. (2002)
Morango	Gasoso, armazenados por 3 dias a 2°C.	Redução da perda de peso, e amolecimento dos frutos tratados, resultando em perda de aroma de fruta.	Nadas et al. (2003)
Tomates fatiados	Aquoso, armazenados a 5°C.	Melhoria da firmeza, manutenção dos parâmetros de qualidade sensorial. Redução da vida de prateleira de 14 para 10 dias a 5 °C.	Aguayo et al. (2013)
Banana	Imersão aquosa por 10 minutos.	Melhoria da qualidade com referência aos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais.	Alencar et al. (2013)
Mamão	Gasoso, por 10, 20 e 30 minutos.	Exposição prolongada reduz a concentração de vitamina C, não afeta a atividade antioxidante.	Yeoh et al. (2014)

FONTE: COELHO et al., 2015, adaptado de FREITAS-SILVA et al. (2013).

2.5 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS FRUTOS

Para que um produto alimentício seja considerado disponível para o consumo, a maior preocupação está relacionada a sua segurança, não apresentando contaminação por agentes químicos, físicos e microbiológicos em concentrações prejudiciais à saúde (VANETTI, 2004). No Brasil, nos anos de 1996 e de 1998 a 2000, foram registrados 192 surtos de infecção alimentar com 12.188 enfermos e 3 mortes, tendo sido a *Salmonella* spp. a responsável pela maioria das contaminações, com incidência em 76,56% destas ocorrências. As hortaliças de folhas e raízes foram responsáveis por 19 (9,9%) surtos (SIRVETA, 2002).

Produtos tais como frutas e hortaliças, tanto *in natura* quanto processados, devem apresentar qualidade microbiológica assegurada com ausência de microrganismos patogênicos e níveis seguros de microrganismos deteriorantes. O

Ministério da Saúde, através da Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001, estabelece os padrões mínimos de qualidade microbiológica para os alimentos que serão consumidos (BRASIL, 2001). Processamentos adequados que assegurem a qualidade microbiológica do produto dever ser feitos sempre. O manuseio do alimento precisa ser apropriado desde o campo, colheita, armazenamento e distribuição do produto para que este não seja contaminado em nenhuma destas etapas.

2.5.1 Microrganismos de interesse

A contaminação de alimentos por microrganismos patogênicos é uma preocupação em todo o mundo. Muitas das matérias-primas utilizadas pelas indústrias alimentícias dos países desenvolvidos são importadas de outros países, nos quais o controle de qualidade da produção de alimentos nem sempre obedece a critérios rigorosos. Por isso, alimentos contaminados são comercializados tanto em países pobres, quanto também em países desenvolvidos. Além disso, a poluição ambiental em diversas partes do planeta tem contaminado alimentos e rebanhos e preocupado a população cada dia mais consciente. Outro fator de contaminação alimentar hoje presente na economia globalizada é a facilidade de distribuição de alimentos industrializados, o que inclui a livre importação, muitas vezes de produtos com qualidade duvidosa. Isto possibilita rápida e extensa contaminação alimentar por diversos microrganismos que vêm causando grandes prejuízos a saúde da população (BALBANI e BUTUGAN, 2001). Ainda de acordo com esses autores, apresentam-se na Tabela 3, os principais agentes microbiológicos que contaminam alimentos.

Tabela 3. Principais agentes microbiológicos que contaminam alimentos

Bactérias	Produtoras de toxinas pré-formadas
	<i>Clostridium botulinum</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	Produtoras de toxinas na luz intestinal
	<i>Vibrio spp</i>
	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
	<i>E. coli</i>
	<i>Salmonella spp</i>
	<i>Campylobacter spp</i>
<i>Yersinia spp</i>	
<i>Shigella spp</i>	
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	
<i>Listeria monocytogenes</i>	
Outras	<i>Aeromonas spp</i>
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
	<i>E. coli</i> enteropatogênica
Fungos	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus parasiticus</i>
Vírus	Vírus da hepatite A
	Vírus da hepatite B
	Rotavírus
	Adenovírus (entérico)
	Parvovírus
Protozoários	<i>Cryptosporidium parvum</i>
	<i>Giardia lamblia</i>
	<i>Entamoeba histolytica</i>
	<i>Isospora belli</i>
	<i>Dientamoeba fragilis</i>
	<i>Blastocystis hominis</i>
Parasitas	<i>Taenia solium</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Taenia saginata</i>
	<i>Hymenolepis nana</i>
	<i>Ascaris</i>
	<i>Trichuris</i>
	<i>Trichinella spiralis</i>
Toxinas	Tetrodotoxina
	Micotoxinas
	Aflatoxinas

FONTE: BALBANI e BUTUGAN (2001). Adaptado de ACHESON (1999)

2.5.1.1 Bactérias

Dados epidemiológicos disponibilizados por órgãos de controle sanitário dos Estados Unidos (EUA) e do Brasil demonstram, por exemplo, que dentre os 2.167 surtos registrados, com etiologia conhecida, nos EUA (Estados Unidos da América), de 1998 a 2002, 55% foram causados por bactérias. No Brasil, entre os anos 1999 a 2008, as bactérias foram identificadas como o agente etiológico responsável de 84% dos surtos (OLIVEIRA et al., 2010). Ainda de acordo com esses autores, no Rio Grande do Sul, Estado que conta com um dos mais ativos serviços de vigilância sanitária e epidemiológica do Brasil, foram notificados 3.200 surtos de 1998 a 2006, sendo que a maioria deles foi causada por bactérias, entre elas *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes.

Bactérias do grupo coliformes são bastonetes gram-negativos, que possuem, como habitat natural, o trato intestinal do homem e de animais. Pertencem à família *Enterobacteriaceae*, incluindo muitos gêneros, tendo como principais a *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*. Podem ser divididos em coliformes totais e fecais, dependendo do habitat do microrganismo (SOUSA, 2006). As contagens de coliformes são muito utilizadas nas análises de alimentos tratados termicamente. Nesse contexto, a presença de bactérias gram-negativas, por exemplo, é um indicativo de tratamentos térmicos inadequados ou de uma provável contaminação posterior (SOUSA, 2006). No presente estudo, as bactérias de importância que serão abordadas são *Salmonella spp.*, coliformes totais e *Escherichia coli* e aeróbios mesófilos.

2.5.1.2 Bolores e Leveduras

Os fungos filamentosos (bolores) são contaminantes comuns em alimentos e são responsáveis por perdas financeiras industriais e comerciais (SERRA et al., 2003). Os fungos são a principal preocupação relativa à fitossanidade, sendo que alguns desses microrganismos apresentam potencial de produção de micotoxinas tanto em armazenamento, quanto em campo, tornando-se um problema à saúde pública (FREITAS-SILVA et al., 2013). O ozônio como método alternativo na conservação de alimentos tem-se mostrado eficiente tanto na eliminação dos fungos, quanto na

desintoxicação dos alimentos, eliminando também as toxinas que esses microrganismos possam produzir.

Os bolores estão relacionados à produção de micotoxinas, o que torna importante o controle da sua proliferação nos alimentos, já que essas micotoxinas podem ser prejudiciais à saúde humana. Esses fungos causam perdas ou redução nas produções de alimentos como frutas e hortaliças, comprometendo a qualidade dos produtos industrializados provenientes destas matérias primas (FORSYTHE, 2002).

As leveduras são outros microrganismos de grande importância para a conservação dos alimentos. Sua relevância está em serem possíveis agentes de deterioração em alimentos que apresentarem condições ótimas para seu desenvolvimento. Observa-se que, dependendo do tipo de alimento e suas características intrínsecas, uma mesma espécie de levedura pode ser benéfica ao processo tecnológico (produção de etanol, cerveja, vinhos) e em outro produto, pode se constituir em agente de deterioração (sucos de frutas) (OETTERER et al., 2006).

Por isso alternativas sustentáveis de sanitizantes que possam eliminar microrganismos possíveis causadores de doenças nos homens e deteriorantes de alimentos são tão importantes nos tempos atuais.

2.6 QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS

A qualidade pode ser definida como um conjunto de atributos físicos e químicos em algum determinado alimento. A aparência, firmeza, sabor e o valor nutricional do morango são exemplos de atributos de qualidade, e são muito importantes e pontos atrativos para o consumidor, sendo estes parâmetros relacionados com sólidos solúveis totais, pH, acidez, compostos bioativos, compostos fenólicos e ácido ascórbico (vitamina C) que influem no sabor e cor do fruto (COSTA, 2009).

Durante o armazenamento, ocorrem modificações em importantes atributos de qualidade do morango, como aparência (tamanho, forma e defeitos), sabor, odor (flavor), e valor nutritivo (CHITARRA, 1999, citado por FIGUEIREDO et al., 2010). Além disso, a carga microbiana também é alterada, e pode afetar os atributos físico-químicos durante o período que o fruto fica armazenado. Os açúcares totais representam os carboidratos de baixo peso molecular e são responsáveis pela doçura, sabor e aroma, pela cor atrativa e pela textura que são representados principalmente pela glicose e

sacarose (LIMA, 1999, citado por FIGUEIREDO et al., 2010). Os teores de açúcares tendem a aumentar com o amadurecimento concomitante com a redução da acidez (CHITARRA e CHITARRA, 2005). A acidez e o pH de polpa são atributos físico-químicos importantes na definição da finalidade de uso das variedades. A característica de pH torna difícil o desenvolvimento de cultivares de dupla aptidão, já que as exigências para cultivares de uso industrial e consumo *in natura* são opostas (FIGUEIREDO et al., 2010).

A avaliação da cor é outro importante atributo para o produtor, pois, determina as condições ideais de colheita e comercialização dos frutos. Os morangos de coloração vermelha, forte e brilhante são os preferidos, embora a cor, na maioria dos casos, não contribui para um aumento efetivo no valor nutritivo ou qualidade sensorial do produto (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

Portanto, um fruto deve apresentar alto valor nutritivo, manter os padrões de qualidade durante o processamento e o armazenamento, e ser seguro do ponto de vista microbiológico para ser atrativo ao consumidor. Um fruto deve estar livre de contaminantes de qualquer espécie (biológico e químico) depois de ter passado por alguma etapa de processamento. Dentre os atributos que podem ser avaliados na qualidade físico-química do morango, podemos citar: perda de massa; acidez titulável; sólidos solúveis totais; pH; e coloração dos frutos.

2.6.1 Perda de massa

Um dos mais importantes fatores a serem observados no desenvolvimento e na pós-colheita de frutos é a perda de massa decorrente de processos metabólicos de síntese, degradação, que sofrem influencia de fatores do ambiente (CHAGAS et al. 2010). O fruto perde massa durante seu armazenamento, e esse fator é importante para avaliar o comportamento do morango quando submetido à ozonização, e posteriormente ao armazenamento.

A perda de umidade é usualmente expressa como perda de massa (%) e pode ser determinada por pesagem do produto ao longo do armazenamento (CHITARRA & CHITARRA, 2005). A perda de massa ocorre naturalmente durante o armazenamento, e pode ser afetada dependendo do processamento que o alimento sofrer.

2.6.2 Acidez Titulável

Em análise de alimentos, é de suma importância a determinação de um componente específico do alimento como é o caso da determinação da acidez. Ela pode ter diferentes finalidades, como avaliação nutricional de um produto; controle de qualidade do alimento; desenvolvimento de novos produtos e a monitoração da legislação (AMORIM et al., 2012). Os ácidos orgânicos presentes em alimentos influenciam o sabor, odor, cor, estabilidade e a manutenção de qualidade (CECCHI, 2003).

A determinação da acidez total em alimentos é bastante importante tendo em vista que através dela, podem-se obter dados valiosos na apreciação do processamento e do estado de conservação dos alimentos (AMORIM et al., 2012).

2.6.3 Sólidos Solúveis Totais

Os sólidos solúveis presentes na polpa dos frutos incluem importantes compostos responsáveis pelo sabor e pela consequente aceitação por parte dos consumidores. Os mais importantes são os açúcares e os ácidos orgânicos. Como indicador de maturidade do fruto, o teor de sólidos solúveis pode ser determinado através de equipamento denominado refratômetro, que fornece os valores em °Brix. O teor de sólidos solúveis pode ser mais preciso para a caracterização dos estádios de maturação e posterior definição do ponto de colheita. Porém, à semelhança da avaliação da firmeza e da cor da polpa, para se determinar o °Brix de um alimento são utilizados frutos triturados em sistema de amostragem, o que implica na destruição dos frutos (EMBRAPA, 2015).

2.6.4 pH

A medida do potencial hidrogeniônico (pH) é importante para as determinações de deterioração do alimento com o crescimento de microrganismos, atividade das enzimas, retenção de sabor e odor de produtos, e escolha de embalagem (CECCHI, 2003). O pH é constituído pela concentração hidrogeniônica da solução, fator intrínseco do alimento, que desempenha papel de seleção sobre a microflora mais apta a

desenvolver-se (CAJAMARCA, 2015). Sua determinação é simples, e usa-se um aparelho denominado pHmetro. A medida do pH é importante para a avaliação de deterioração nos alimentos, como o crescimento de microrganismos, atividade das enzimas, retenção de sabor e odor de produtos (LUCENA, 2006 citado por CAJAMARCA, 2015).

2.6.5 Coloração dos frutos

A cor é um atributo de importância fundamental no julgamento da qualidade de um alimento, uma vez que a apreciação visual é o primeiro dos sentidos a ser usado pelo consumidor, sendo, portanto, uma característica decisiva na escolha e aceitação do produto (LIMA et al., 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, no Laboratório de Leites e Derivados e no Laboratório de Análise de Alimentos, localizados na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, na Universidade de Brasília, UnB, no Distrito Federal.

3.1 OBTENÇÃO DOS MORANGOS

Os morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) da variedade “Portola” foram adquiridos diretamente de um produtor da região administrativa de Brazlândia no Distrito Federal, durante a safra do 2º semestre de 2016. Na produção dos frutos não foram utilizados agroquímicos, mas não é certificada como orgânica, pois há o uso de fertilizantes químicos, sem adubação nitrogenada. A escolha por esse tipo de cultivo foi justificada pela necessidade da não interferência dos defensivos químicos nos parâmetros microbiológicos.

Os frutos (Figura 1), foram colhidos no estágio de maturação comercial (3/4 maturação), e depois eram transportados para o Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Vegetais, colocados sobre refrigeração, a 5 °C por um período de aproximadamente 12 horas. No dia seguinte, os morangos foram devidamente selecionados, aqueles que apresentaram ferimentos ou lesões foram descartados e somente os frutos uniformes, sadios, sem defeitos foram submetidos ao processo de ozonização.



Figura 1. Frutos comprados diretamente do produtor

FONTE: Arquivo pessoal.

3.2 OBTENÇÃO DO GÁS OZÔNIO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GÁS

O gás ozônio (Figura 2) foi obtido por meio de um gerador de ozônio baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (Modelo O&L 3.0-O2 RM). Este tipo de descarga é produzido ao aplicar uma alta tensão entre dois eletrodos paralelos, tendo entre eles um dielétrico (vidro) e um espaço livre por onde flui o ar seco. Neste espaço livre, é produzida uma descarga em forma de filamentos, em que são gerados elétrons com energia suficiente para produzir a quebra das moléculas de oxigênio, formando o ozônio (O_3). No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo oxigênio (O_2) com grau de pureza de aproximadamente 90%, isento de umidade, obtido de concentrador de oxigênio acoplado ao gerador de ozônio.



Figura 2. Gerador de ozônio Modelo O&L 3.0-O2 RM

FONTE: Arquivo pessoal.

A concentração de ozônio foi determinada pelo método iodométrico, descrito por Clesceriet al. (2000), que consiste no borbulhamento do ozônio em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 1 N, com produção de Iodo (I_2). Para garantir o deslocamento da reação para a produção de I_2 , foi necessário acidificar o meio com 2,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N. A solução foi titulada com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) 0,01 N, com uso de solução de amido 1% como indicador.

3.3 OZONIZAÇÃO DOS FRUTOS

Inicialmente, os frutos foram acondicionados em recipientes de vidro com capacidade de 3,2 L submetidos ao processo de ozonização com o ozônio gasoso. Os morangos foram submetidos ao gás ozônio nas concentrações de 4, 9, 14 e 18 $mg L^{-1}$, vazão de 1 $L min^{-1}$, na temperatura de 25 °C, por 30 min, com três repetições. O tratamento controle (testemunha) correspondeu a frutos não ozonizados (concentração 0 $mg L^{-1}$).

Depois da ozonização, amostras de aproximadamente 200 g foram colocadas em embalagens de polietileno retangulares (12 cm x 18 cm), transparentes e com a

devida identificação para cada repetição dos tratamentos. Posteriormente, as embalagens contendo os frutos foram armazenadas em uma câmara climática tipo B.O.D, na temperatura de 5 °C. Realizaram-se análises microbiológicas e da qualidade físico química imediatamente depois da ozonização (dia zero) e a cada dois dias até o sexto dia de armazenamento.

3.4 ANÁLISES DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DOS FRUTOS

3.4.1 Recepção e preparo das amostras

A metodologia utilizada na recepção e o preparo das amostras foi de acordo com Silva et al., (2001): em um ambiente devidamente esterilizado as embalagens contendo 200 g de morangos foram desinfetadas externamente com álcool 70%, depois a embalagem foi aberta para a retirada asséptica de 25 g de amostra coletadas em diferentes partes do fruto e colocadas em sacos plásticos devidamente identificados e mantidos em congelamento.

3.4.2 Preparo das diluições seriadas das amostras de morango

Inicialmente, 25 g de morangos foram diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1% (p/v) devidamente esterilizada, a fim de obter diluições seriadas para a realização das análises microbiológicas. A partir da diluição 10^{-1} foram feitas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , para a detecção *Salmonella* spp. e para a contagem de coliformes totais e *E.coli*, bolores e leveduras e aeróbios mesófilos, conforme protocolo descrito pela Instrução Normativa número 62, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

3.4.3 Contagem de bolores e leveduras

Foram utilizadas placas Petrifilm da marca 3M para contagens de bolores e leveduras. A Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Leveduras e Bolores (YM) é um meio de cultura pronto para uso que contém um agente geleificante solúvel em água

fria, nutrientes e um corante indicador para dar contraste e facilitar a contagem. Para contagem de Bolores e Leveduras foram utilizadas as diluições de 10^{-3} e 10^{-4} . A incubação seguiu o Método Oficial AOAC 997.02 com incubação de 5 dias a 20-25 °C (AOAC, 2012). Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC g⁻¹), posteriormente em log UFC g⁻¹.

3.4.4 Contagem de Aeróbios Mesófilos

Foram utilizadas placas Petrifilm da marca 3M para contagens de aeróbios. A Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Aeróbios (AC), que é um sistema de meio de cultura pronto para uso, que contém os nutrientes do Método Padrão, um agente geleificante solúvel em água fria, e um indicador que facilita a enumeração das colônias. As placas 3M™ Petrifilm™ AC são utilizadas para enumeração de bactérias aeróbias mesófilas. Corante indicador vermelho na placa dá cor às colônias. Para contagem de Aeróbios mesófilos foram utilizadas as diluições de 10^{-3} e 10^{-4} . A incubação seguiu o Método Oficial AOAC 990.12, em placas de alimentos, Filme Reidratado Seco, com incubação por 48h ± 3h a 35°C ± 1°C (AOAC, 2012). Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC g⁻¹), posteriormente em log UFC g⁻¹.

3.4.5 Detecção de *Salmonella* spp.

O pré-cultivo usado como amostra padrão dos coliformes, foi aproveitado e incubado por 24 horas em estufa bacteriológica a 35 °C, sendo transferidas alíquotas de 1 mL para tubos que continham 10 mL de caldo selenito cistina (Fluka Analytical) e 0,1 ml para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Rapaport – Vassiliadi (Acumedia), os quais foram incubados numa estufa a 35 °C, durante 24 horas, para o enriquecimento seletivo. A etapa seguinte foi o plaqueamento diferencial, baseada nos tubos de enriquecimento seletivo, que com o auxílio de alçadas, e para cada meio foram repicadas em placas contendo Agar Salmonela Shigella (Acumedia) e depois as placas foram colocadas de forma invertida em estufa bacteriológica a 35 °C, durante 24 horas para confirmar a presença da bactéria. As placas nas quais se suspeitava conter

Salmonella spp. foram selecionadas para as provas bioquímicas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI), ágar lisina ferro (LIA) e caldo ureia, seguindo o protocolo descrito IN62 – 2003 (BRASIL, 2003) e os parâmetros RDC 12 (BRASIL, 2001).

3.4.6 Contagem de coliformes totais e *E.coli*

Foram utilizadas placas Petrifilm da marca 3M para contagens de coliformes totais e *E.coli*. As Placas 3M™ Petrifilm™ para Contagem de *E.coli* e Coliformes (EC) contêm nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB), um agente geleificante solúvel em água fria, um indicador de atividade glicuronidásica e um indicador que facilita a enumeração da colônia. Para contagem de *E. coli* e coliformes totais foi utilizada a diluição de 10^{-1} e 10^{-2} . A incubação seguiu o Método Oficial AOAC 991.14 com incubação de $24\text{h} \pm 2\text{ h}$ para coliformes totais e a $35^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ para *E. coli* (AOAC, 2012). Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC g^{-1}), posteriormente em $\log\text{ UFC g}^{-1}$.

3.5 ANÁLISES DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DOS FRUTOS

3.5.1 Perda de Massa

A perda de massa foi determinada pela diferença entre a massa fresca inicial das unidades experimentais e a massa final após cada período de armazenamento e expressa em porcentagem.

3.5.2 Acidez Total Titulável (ATT)

A determinação de acidez total titulável foi realizada conforme método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005) e os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

3.5.3 Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os sólidos solúveis foram determinados em refratômetro digital Atago (Modelo 1T). Os resultados serão expressos em °Brix (AOAC, 2002).

3.5.4 Potencial Hidrogeniônico (pH)

O pH foi determinado através do potenciômetro Digimed Mod. DM21 (IAL, 2005).

3.5.5 Relação entre Sólidos Solúveis Totais e Acidez Titulável (SST/AT)

A partir dos valores obtidos referentes a Sólidos Solúveis Totais e Acidez Titulável foi possível a obtenção da relação SST/AT.

3.5.6 Coloração dos frutos

A avaliação da coloração dos frutos submetidos ou não a ozonização durante o armazenamento foi realizada com o auxílio do colorímetro ColorQuest XE da HunterLab. O equipamento foi devidamente calibrado e os valores foram tomados da polpa dos frutos, realizando-se duas leituras das amostras de cada repetição. Com os valores das coordenadas L, a e b é possível obter parâmetros relacionados à tonalidade h (Equação 1), à saturação da cor ou croma C (Equação 2) e à diferença de cor ΔE (Equação 3) (LITTLE, 1975, FRANCIS, 1975, MCLELLAN et al., 1995, MASKAN, 2001).

$$h = \arctang(b/a) \quad (1)$$

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (2)$$

$$\Delta E = \sqrt{((L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2)} \quad (3)$$

em que:

h = tonalidade da cor;

C = saturação da cor ou croma;

ΔE = diferença de cor;

L = mensurável em termos de intensidade de branco a preto;

a = mensurável em termos de intensidade de vermelho e verde; e

b = mensurável em termos de intensidade de amarelo e azul.

L_0 , a_0 e b_0 são as coordenadas obtidas no início do armazenamento dos frutos.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em Esquema Fatorial 5X4, sendo cinco tratamentos e quatro períodos de armazenamento (0, 2, 4 e 6 dias), com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância e posteriormente análise de regressão ou teste de média. Utilizou-se o software Assistat na análise de variância e teste de média e o software SigmaPlot para a obtenção das equações e plotagem dos gráficos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa na contagem de bolores e de leveduras em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento ($p < 0,05$). Na Figura 3, são apresentadas as curvas nos quais se relaciona contagem de bolores e leveduras e período de armazenamento, para cada um dos tratamentos. As equações de regressão e os respectivos coeficientes de determinação relativos aos frutos ozonizados ou não e armazenados a 5 °C, encontram-se na Tabela 4.

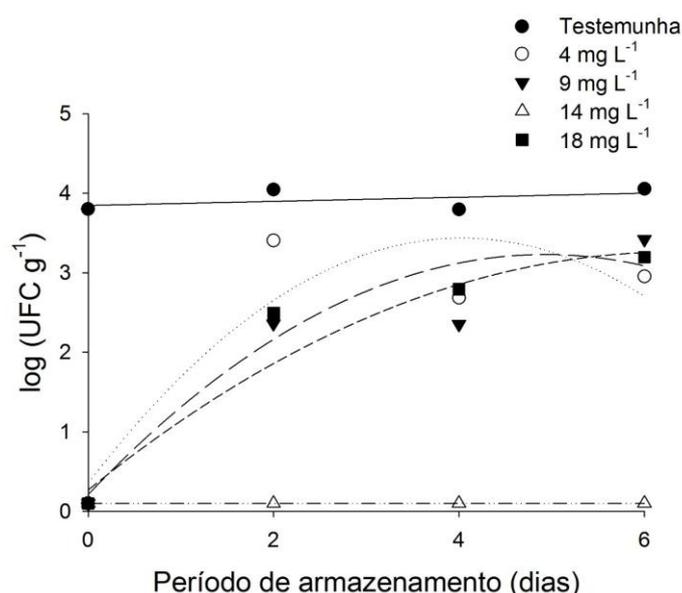


Figura 3. Contagem de Bolores e Leveduras ($\log \text{UFC g}^{-1}$) em morangos ozonizados em diferentes concentrações do gás e armazenados por seis a 5 °C.

Tabela 4. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de bolores e leveduras em morango, expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C

Tratamento	Equação de regressão ajustada	R ²
Testemunha (0 mg L ⁻¹)	$\bar{y} = 3,8463 + 0,0260x$	0,21
4 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,3511 + 1,5300x - 0,1897x^2$	0,81
9 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,2672 + 0,9442x - 0,0744x^2$	0,90
14 mg L ⁻¹	$\bar{y} = -*$	-
18 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,2097 + 1,2253x - 0,1243x^2$	0,96

* Não foram quantificados bolores e leveduras nesse tratamento.

Verificou-se, imediatamente depois da ozonização (período zero) contagem de bolores e leveduras inferiores a 0,2 ciclo log em todos os tratamentos referentes aos morangos expostos ao gás ozônio em concentrações entre 4 e 18 mg L⁻¹, por 30 minutos (Figura 3). Por outro lado, nos frutos não ozonizados (testemunha), a contagem de bolores e leveduras foi de aproximadamente 3,8 ciclos log, o que acarreta diferença superior a 3,5 ciclos log, quando se compara com os resultados obtidos nos frutos ozonizados. Quando se analisou a tendência ao longo do armazenamento por até seis dias, na temperatura de 5 °C, observou-se que nos frutos não ozonizados a contagem de bolores e leveduras permaneceu em torno de 3,8 ciclos log. Com relação aos frutos ozonizados nas concentrações de 4, 9 e 18 mg L⁻¹, houve incremento na contagem de bolores e leveduras à medida que se elevou o período de armazenamento. Deve-se destacar que apesar disso, a contagem de bolores e leveduras nos frutos ozonizados permaneceu inferior aos valores obtidos naqueles não ozonizados (testemunha). No que tange aos frutos ozonizados na concentração de 14 mg L⁻¹, não foi possível a quantificação de bolores e leveduras por até seis dias de armazenamento, de acordo com a técnica adotada. A presença de bolores e leveduras nos frutos ozonizados na concentração de 18 mg L⁻¹, diferentemente do observado quando se adotou a concentração de 14 mg L⁻¹, pode ser explicado pelo fato de que concentrações muito elevadas podem alterar as características do produto, podendo inclusive favorecer o crescimento de microrganismos (ALENCAR et al., 2013).

No que se refere a contagem de mesófilos aeróbios, nos frutos submetidos ou não a ozonização e armazenados a 5 °C, obteve-se diferença significativa em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento, de acordo com a análise de variância (p<0,05). As curvas referentes à contagem de mesófilos aeróbios em morangos submetidos à ozonização são apresentadas na Figura 4. Encontram-se na Tabela 5 as equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação para contagem de mesófilos aeróbios.

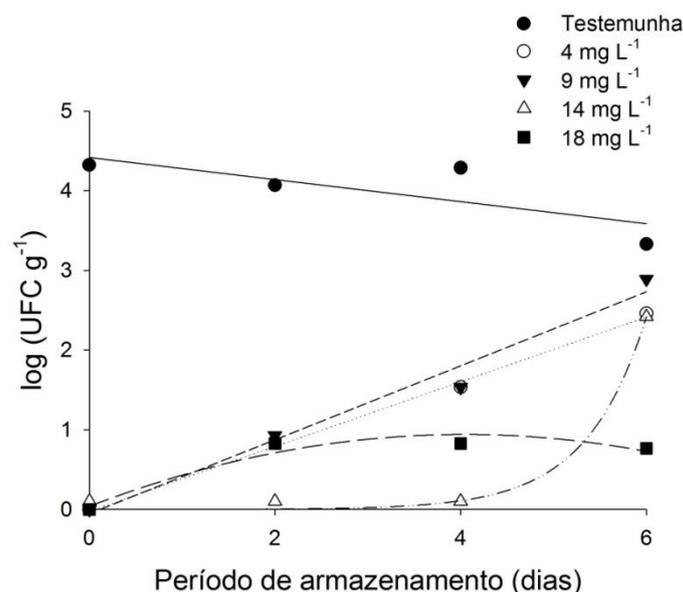


Figura 4. Contagem de Aeróbios Mesófilos (log UFC g⁻¹) em morangos ozonizados em cinco diferentes concentrações do gás e armazenados por seis dias a 5 °C.

Tabela 5. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de aeróbios em morango, expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C.

Tratamento	Equação de regressão ajustada	R ²
Testemunha (0 mg L ⁻¹)	$\bar{y} = 4,4182 - 0,1386x$	0,60
4 mg L ⁻¹	$\bar{y} = -0,0227 + 0,4062x$	0,99
9 mg L ⁻¹	$\bar{y} = -0,0547 + 0,4643x$	0,98
14 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,0002 + 1,5488x$	0,99
18 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,0384 + 0,4467x - 0,0553x^2$	0,99

A ozonização se mostrou eficiente na inativação de aeróbios mesófilos, quando se adotaram concentrações na faixa entre 4 e 18 mg L⁻¹, por 30 minutos. Imediatamente depois da ozonização, foi possível obter redução superior a 4,0 ciclos log na contagem de mesófilos aeróbios, quando se comparou os resultados obtidos nos frutos ozonizados, com os obtidos ao analisar os aqueles não expostos ao gás. Durante o armazenamento por até seis dias, houve incremento da contagem de mesófilos aeróbios nos frutos submetidos à ozonização, porém os valores permaneceram inferiores aos obtidos nos frutos não ozonizados (testemunha). Depois de seis dias de armazenamento, verificou-se

menor contagem de mesófilos aeróbios nos frutos ozonizados na concentração de 18 mg L⁻¹, sendo estimado em aproximadamente 0,7 ciclo log, enquanto que o equivalente para os frutos não ozonizados foi de 3,6 ciclo log.

A inativação de microrganismos pelo ozônio, segundo Cullen et al. (2009), é atribuída, principalmente, à ruptura do envoltório celular e posterior dispersão dos constituintes citoplasmáticos, uma vez que esse gás apresenta alto poder oxidante. De acordo com Victorin (1992), citado por Alencar et al. (2012), existem dois mecanismos do ozônio na destruição de biomoléculas. No primeiro mecanismo, o ozônio oxida grupos sulfidril e aminoácidos de enzimas, proteínas e peptídeos. No segundo mecanismo, ocorre a ação do gás como agente oxidante de ácidos graxos poli-insaturados a peroxiácidos. Essa capacidade do ozônio de inativar ou inibir o desenvolvimento dos microrganismos é fundamental sob o ponto de vista de segurança do alimento, pois pode representar uma forma de controle de diferentes espécies de microrganismos, especialmente os patogênicos. Cajamarca (2015) verificaram decréscimo na contagem de mesófilos aeróbios em morangos, em decorrência da exposição ao ozônio, nas concentrações de 4,27 e 2,14 mg L⁻¹, por até 60 minutos. Entretanto, esse autor não observou redução na contagem de bolores e leveduras nos frutos ozonizados.

Não foram detectados *Salmonella* spp. e quantificados *E. coli* nos morangos submetidos ou não a ozonização. Com relação à contagem de coliformes totais, apesar de ter sido quantificado, os dados não são conclusivos, uma vez que nem todas as amostras apresentavam esse grupo de microrganismos. Dessa forma, não foi possível inferir sobre a capacidade do ozônio de inativar *Salmonella* spp., coliformes totais e *E. coli* em morangos.

É importante ressaltar que de acordo com o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, no caso de morangos frescos e similares, "*in natura*", inteiros, selecionados ou não, é exigido ausência de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011). Mesmo resultado foi encontrado para esse microrganismo em trabalho feito por Cajamarca (2015).

Não foi observada variação significativa ($p>0,05$) em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento para as variáveis perda de massa, pH, sólidos solúveis totais (SST, °Brix), relação SST/ATT e coloração dos frutos (saturação e tonalidade de cor). Entretanto, houve variação significativa ($p<0,05$) para essas

variáveis quando se analisaram o efeito da exposição ao ozônio e do período de armazenamento, separadamente.

Na Tabela 6, são apresentados os valores médios referentes à perda de massa (PM), ao pH, aos sólidos solúveis totais (SST), à relação SST/ATT e a tonalidade de cor nos frutos submetidos a diferentes concentrações do gás ozônio, independentemente do período de armazenamento. Observou-se tendência de redução da perda de massa nos frutos à medida que se elevou a concentração do gás. Nos frutos não ozonizados, o percentual de perda de massa nos frutos não ozonizados (testemunha) foi de 4,23%, enquanto que naqueles ozonizados na concentração de 18 mg L⁻¹ foi de 1,83%. Apesar de ter sido verificada diferença significativa na variável pH, não foi possível relacionar com a ozonização. Os valores permaneceram em torno de 3,50. No que se refere às variáveis SST e SST/ATT, destaca-se a diferença significativa observada somente quando se comparou os valores médios obtidos nos frutos não ozonizados com aqueles obtidos no produto ozonizado na concentração de 4 mg L⁻¹. Foram obtidos maiores valores médios de SST e relação SST/ATT nos frutos ozonizados, equivalentes a 8,69 °Brix e 10,75, respectivamente. Nos frutos não ozonizados, os valores médios de SST e relação SST/ATT foram iguais e a 7,85 °Brix e 9,59, respectivamente.

Tabela 6. Valores médios de perda de massa (PM), pH, sólidos solúveis totais (°Brix, SST), SST/ATT e a tonalidade de cor (h°) nos frutos submetidos a diferentes concentrações do ozônio, independentemente do período de armazenamento

Variável	Tratamento				
	Testemunha 0 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹	9 mg L ⁻¹	14 mg L ⁻¹	18 mg L ⁻¹
PM (%)	4,23 ± 4,51 a	3,56 ± 2,38 ab	2,30 ± 2,33 b	2,98 ± 2,58 ab	1,83 ± 1,60 b
pH	3,52 ± 0,11 ab	3,57 ± 0,10 a	3,50 ± 0,06 ab	3,55 ± 0,08 ab	3,47 ± 0,14 b
SST	7,85 ± 0,30 b	8,69 ± 1,10 a	8,08 ± 0,36 ab	8,10 ± 0,49 ab	8,19 ± 0,18 ab
SST/ATT	9,59 ± 0,99 b	10,75 ± 1,25 a	9,83 ± 0,65 ab	10,09 ± 0,50 ab	9,80 ± 0,57 ab
Tonalidade (h°)	30,58 ± 3,07 ab	29,83 ± 4,09 b	31,17 ± 3,37 a	30,93 ± 3,44 ab	30,67 ± 3,47 ab

Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 5, é apresentada a curva de regressão para perda de massa em função do período de armazenamento, independentemente da exposição ao gás ozônio. A tendência observada está de acordo com o esperado, ou seja, incremento da perda de massa à medida que se eleva o período de armazenamento.

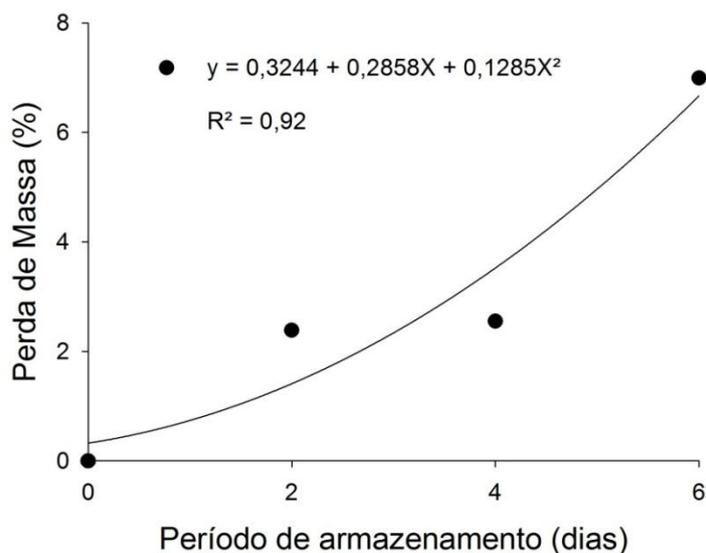


Figura 5. Perda de massa (%) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.

Cajamarca (2015) verificou incremento do percentual da perda de massa fresca de morangos ao longo do armazenamento, sendo a tendência mais acentuada no tratamento controle (não ozonizados), quando comparado com frutos ozonizados. Simão e Rodriguez (2009) avaliaram a perda de massa em tomates, e constataram com a ozonização as perdas de massa foram reduzidas em aproximadamente 50 % durante armazenamento. Resultados diferentes foram encontrados por Kechinski (2007), que não encontrou diferença significativa para perda de massa em mamão papaia ozonizado, que mostrou que o gás o ozônio não afetou a perda de massa fresca desses frutos. Resultados semelhantes aos de Kechinski (2007) também foram observados por Forney et al. (2007) em cenoura.

No que tange a acidez total titulável (ATT) nos morangos, observou-se variação significativa em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento ($p < 0,05$). Enquanto que nos frutos não ozonizados (testemunha) e naqueles ozonizados na concentração de 4 mg L⁻¹, foi observada ligeira tendência de

redução da acidez à medida que se elevou o período de armazenamento, houve incremento da acidez nos frutos ozonizados na concentração de 18 mg L⁻¹, depois do quarto dia de armazenamento (Figura 6). Os valores estimados de acidez total titulável nos frutos não ozonizados e naqueles ozonizados na concentração de 18 mg L⁻¹, foram 0,76 e 0,86, respectivamente. Na Tabela 7 são apresentadas as equações de regressão e respectivos coeficientes de determinação para acidez total titulável nos morangos ozonizados nas concentrações de até 18 mg L⁻¹, por seis dias de armazenamento, na temperatura de 5 °C..

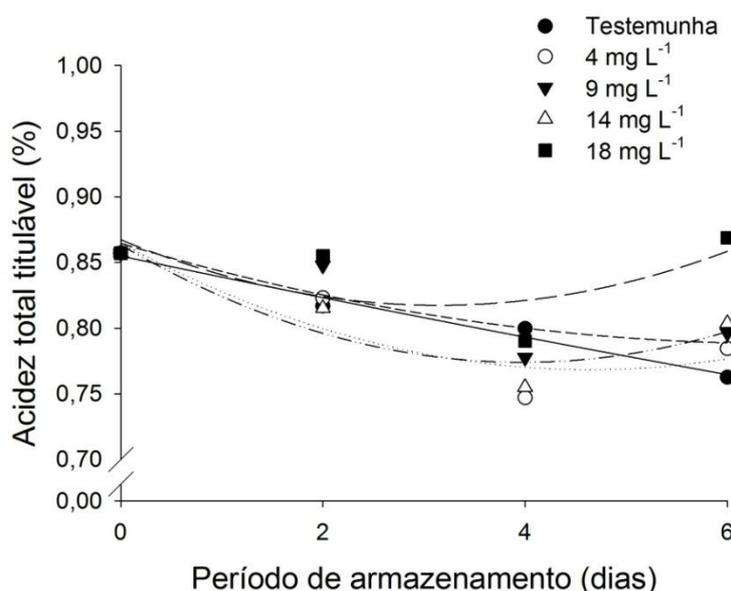


Figura 6. Acidez total titulável (%) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.

Tabela 7. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à Acidez Titulável (%), expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C.

Tratamento	Equação de regressão ajustada	R ²
Testemunha (0 mg L ⁻¹)	$\bar{y} = 0,8550 - 0,0162x + 0,0002x^2$	0,98
4 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,8649 - 0,0416x + 0,0045x^2$	0,82
9 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,8647 - 0,0232x + 0,0018x^2$	0,75
14 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,8635 - 0,0450x + 0,0057x^2$	0,85
18 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,8674 - 0,0318x + 0,0050x^2$	0,44

Segundo Chitarra (1990), ocorre uma diminuição da acidez com o amadurecimento dos frutos, pois os ácidos orgânicos voláteis e não voláteis estão entre os constituintes celulares mais metabolizados no processo de amadurecimento. Então, pode-se inferir que o ozônio pode retardar o amadurecimento de morango, em determinadas condições. Todavia, os resultados encontrados neste experimento foram diferentes aos de Cajamarca (2015), de Nadas et al. (2003) e de Rahman et al. (2014), que não mostraram diferenças significativas para acidez total titulável em frutas ozonizadas.

Apresentam-se nas Figuras 7 e 8 as curvas referentes às variáveis sólidos solúveis totais (SST) e pH, respectivamente, nos morangos em função do período de armazenamento, independentemente da ozonização. Observou-se ligeiro incremento dessas duas variáveis durante o armazenamento. Os sólidos solúveis totais nos frutos permaneceram na faixa entre 8,00 e 8,60 °Brix, enquanto que o pH variou entre 3,40 e 3,65. No que se refere ao pH, Holtz (2006) encontrou resultados diferentes para morangos minimamente processados. Esse autor observou decréscimos nos valores de pH nos morangos tratados com ozônio. Monaco (2015) avaliou o pH durante o armazenamento de manga, com frutas obtidas em diferentes tipos de cultivo, e concluiu que independentemente do sistema, o pH da manga não foi influenciada por cloro ou ozônio no seu experimento.

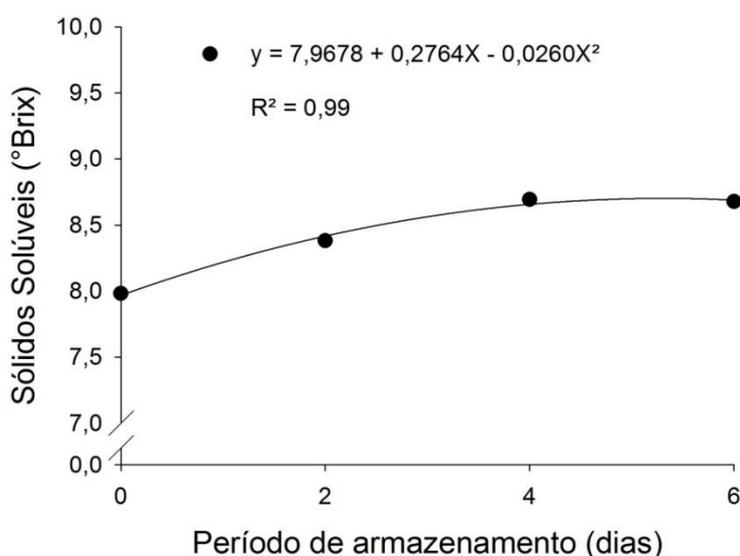


Figura 7. Sólidos Solúveis Totais (°Brix) em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.

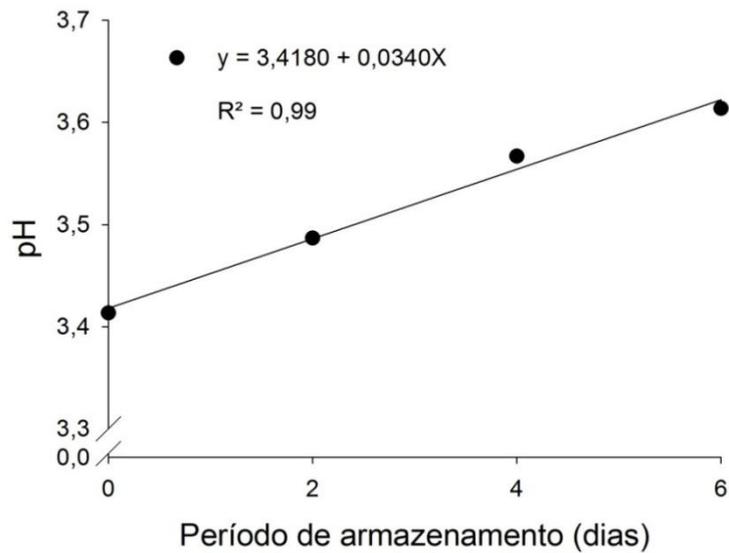


Figura 8. Curva de pH em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.

Na figura 9 é apresentada a curva na qual se tem a relação SST/ATT em função do período de armazenamento. Verificou-se incremento dessa variável à medida que se elevou o período de armazenamento. A relação SST/ATT permaneceu na faixa entre 9,3 e 10,9.

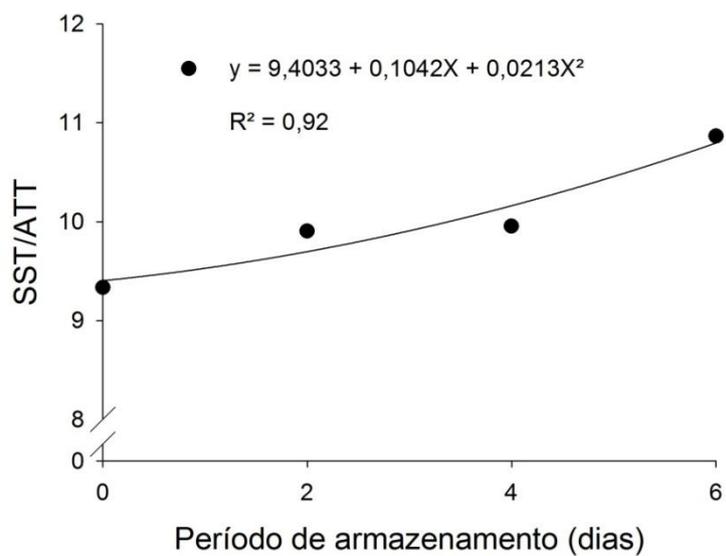


Figura 9. Relação SST/ATT em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.

As curvas de regressão de tonalidade de cor (h°) e saturação de cor (croma) de morangos, independentemente da ozonização, em função do período de armazenamento são apresentados nas Figuras 10 e 11. Para ambas as variáveis, observou-se tendência de incremento até o segundo dia de armazenamento com posterior decréscimo.

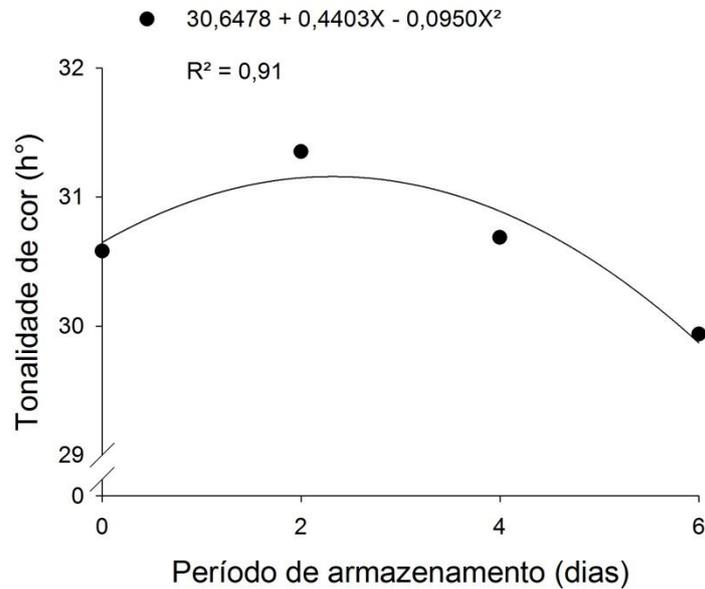


Figura 10. Tonalidade de cor (h°) em morangos armazenados na temperatura de 5°C , por seis dias.

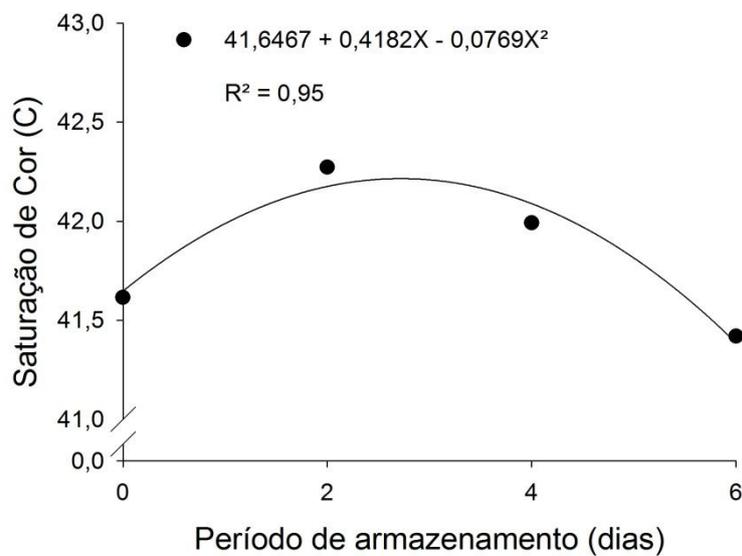


Figura 11. Saturação de cor (croma) em morangos armazenados na temperatura de 5°C , por seis dias.

No que se refere à diferença de cor (ΔE), Figura 12, obteve-se diferença significativa em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento ($p < 0,05$). Verificou-se aumento da diferença de cor à medida que se elevou o período de armazenamento, porém essa tendência foi menos acentuada nos morangos não ozonizados (testemunha). Ressalta-se que a variável diferença de cor foi obtida a partir dos valores de L, a e b, em um determinado período de armazenamento e os valores correspondentes a um padrão, que no presente trabalho, referiu-se aos frutos no início do armazenamento. Dessa forma, uma maior elevação da diferença de cor implica em um distanciamento mais pronunciado da cor inicial, comportamento observado nos morangos ozonizados à medida que aumentou a concentração do gás. Resultados diferentes foram observados por Cajamarca (2015), que observou uma diferença maior de cor em morangos orgânicos não ozonizados, comparando com morangos tratados com o ozônio. Entretanto esse autor utilizou concentrações do ozônio inferiores às testadas no presente trabalho. Simão (2011), em sua pesquisa com tomates, somente observou ligeira alteração na diferença de cor quando, a partir do sétimo dia, quando comparou os resultados com os obtidos no grupo controle. Em pesquisa realizada por Ribeiro (2013), os valores médios da diferença de cor (ΔE) nas raízes de batata baroa, ao longo do período de armazenamento, não foram significativos quando expostas ou não ao ozônio dissolvido em água, em nenhum dos diferentes tempos de exposição da pesquisa.

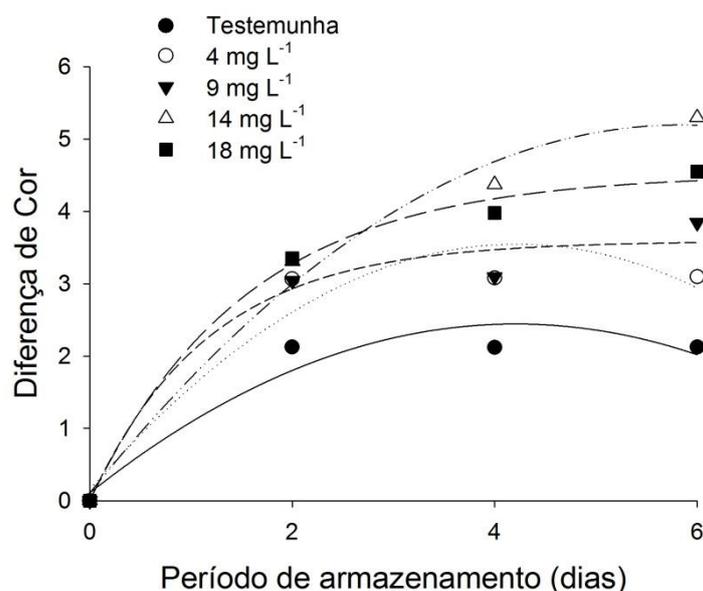


Figura 12. Diferença de Cor em morangos armazenados na temperatura de 5°C, por seis dias.

Encontram-se, na Tabela 8, as equações de regressão ajustadas e os respectivos coeficientes de determinação referentes a diferença de cor (ΔE) em morangos ozonizados em diferentes concentrações do gás, e armazenados a 5 °C, por seis dias.

Tabela 8. Equações de Regressão Ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à Diferença de cor, expostos ao gás ozônio em diferentes concentrações e armazenadas a 5 °C.

Tratamento	Equação de regressão ajustada	R ²
Testemunha (0 mg L ⁻¹)	$\bar{y} = 0,1068 + 1,1105x - 0,1320x^2$	0,93
4 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,1525 + 1,6083x - 0,1906x^2$	0,93
9 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 3,5911 (1 - e^{(-0,8459x)})$	0,97
14 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 4,5187 (1 - e^{(-0,6436x)})$	0,99
18 mg L ⁻¹	$\bar{y} = 0,1058 + 1,7417x - 0,1491x^2$	0,96

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que o ozônio é um importante agente antimicrobiano e nas condições adotadas no trabalho provocou redução de bolores e leveduras e de mesófilos aeróbios. O gás também não interferiu na maioria dos parâmetros físico-químicos avaliados. Vale salientar que é importante dar prosseguimento às pesquisas com o uso desse gás, de tal forma que o uso dessa tecnologia seja difundido na indústria de alimentos. No que se refere ao morango, é fundamental a realização de análise sensorial para avaliar a aceitação do produto ozonizado.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACHESON, D. W. K. Food borne infections. **Current opinion in gastroenterology**, v. 15, n. 6, p. 538, 1999.

AGEITEC, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA**. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/morango/arvore/CONT000fmxotm4d02wyiv8065610do1fgl2q.html>> Acesso em 16 de janeiro de 2017.

AGUAYO, E.; ESCALONA V.; SILVEIRA A. C.; ARTÉS F. Quality of tomato slices disinfected with ozonated water. **Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 20, n. 3, p. 227-235, 2014.

AGUAYO, E.; JANSASITHORN, R.; KADER, A. A. Combined effects of 1-methylcyclopropene, calcium chloride dip, and/or atmospheric modification on quality changes in fresh-cut strawberries. **Postharvet Biology and Technology**, v.40, p.269-278, 2006.

AKBAS, M.Y.; OZDEMIR, M. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. **Food Microbiology**, v.25, p.386–391, 2008.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R.; SOARES, N. F. F.; SILVA, W.A.; SILVA M. C. C. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 899-905, 2012.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D ; PINTO, M. S. ; COSTA, A. R. Postharvest quality of ozonized 'nanicão' cv. bananas. **Revista Ciência Agronômica (UFC. Online)**, v. 44, p. 107-114, 2013.

ALLEN, B.; WU, J.; DOAN, H. Inactivation of Fungi Associated with Barley Grain by Gaseous Ozone. **Journal of Environmental Science and Health, Part B-Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v.B38, n.5, p.617–630, 2003.

AMORIM, A. G.; SOUZA, A. O.; SOUSA, T. A. Determinação do pH e Acidez Titulável da farinha de semente de abóbora (*Cucurbita maxima*). In: VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. 2012.

ANTUNES, M. C. **Qualidade de frutos de seis cultivares de morangueiro**. 40 f. Dissertação (mestrado). Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Universidade Federal do Paraná. 2013.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17^a ed. Arlington: 2002.

AOQUI, G. Interozone do Brasil Ltda. Divulgação da empresa, lay-outs de processos, imagens e resultados de pesquisas aplicadas. 2009.

ÁVILA, M. B. R. D. . **Ozônio como agente de degradação de resíduos de inseticidas em grãos de arroz.** 69 f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa. 2015.

BACHELLI, M. L. B. **Avaliação da radiação ultravioleta ce água ozonizada para sanitização de alface e mamão minimamente processados.** 95 f. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. 2016.

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v. 23, n. 4, p. 320-328, 2001.

BIALKA, KATHERINE L.; DEMIRCI, A. Utilization of Gaseous Ozone for the Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella on Raspberries and Strawberries. **Journal of Food Protection**, v. 70, issue 5, p. 1093-1098. 2007.

BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 1, p. 3- 11, 2004.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção I, p. 45-53. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.

CAJAMARCA, S. M. N. **Ozonização como método alternativo na conservação de morango produzido em sistema orgânico.** 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de Brasília. 2015.

CARVALHO, S. F.; FERREIRA, L. V., COCCO, C.; PICOLOTTO, L.; CANTILLANO, R. F. F.; EDUARDO, L.; ANTUNES, C. Caracterização física e química de cultivares de morango de dias neutros. XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura. 2012.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos.** 2. ed. Editora da Unicamp, 2003.

CHAGAS, G. S. Avaliação de mudanças físicas no fruto do maracujá-selvagem *P. tenuifila* durante seu desenvolvimento e após a colheita. **III Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG; III Jornada Científica.** Campus Bambuí: IFMG, 2010.

CHIATTONE, P. V.; TORRES, L. M.; ZAMBIAZI, R. C. Application of ozone in industry of food. **Alimentos e Nutrição**, v.19, p.341-349, 2008.

CHITARRA, M. I. F. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. ESAL/FAEPE, 1990.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 785p. 2005.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A.E. EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Denver: American Water Works Association, 1220p, 2000.

COELHO, C. C. de S., FREITAS-SILVA, O., ALCANTARA, I., DA SILVA, J. P. L., CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 369-375, 2015.

COSTA, A. R. **Ozônio como agente fungicida na pós-colheita do mamão (*Caricapapaya L.*)**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. 2012.

COSTA, F. B. **Fisiologia da conservação de cultivares de morangos inteiros e minimamente processados**. 115 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa. 2009.

CRISTIANINI, M., TRIBST, A. A. L., JÚNIOR, B. R. D. C. L.; CAVALCANTE, D. A. Sanitização de alface americana com água ozonizada para inativação de *Escherichia coli* O157: H7. **Segurança Alimentar e Nutricional**. v. 21(1), p. 373-378. 2015.

CULLEN, P. J.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.125-136, 2009.

DHILLON, B. D. WIESENBERN, C.; WOLF-HALL, F. Manthey. Development and evaluation of an ozonated water system for antimicrobial treatment of durum wheat. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. E396-E403, 2009.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2.ed. RiMa. 1565p., 2005.

EMATER-DF. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal. **Produção Agropecuária 2011**. Disponível em <<http://www.emater.df.gov.br/>> Acesso: 02 de dezembro 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Teor de Sólidos Solúveis**. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia22/AG01/arvore/AG01_147_24112005115227.html> Acesso em 09 de dezembro 2016.

FARIAS, J. F. de; SILVA, L. J. B. da; ARAÚJO NETO, S. E. de; MENDONÇA, V. Qualidade do maracujá-amarelo comercializado em rio branco, **Revista Caatinga**, v. 20, n. 3, p. 196-202. 2007.

FDA. Food and Drug Administration. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Federal Register, v.66, n.123, p.33829-33830, 2001.

FERLA, N. J.; MARCHETTI, M. M.; GONÇALVES, D. Ácaros predadores (*Acari*) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp., Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 1-8, 2007.

FERNANDES-JÚNIOR, F., FURLANI, P. R., RIBEIRO, I. J. A., CARVALHO, C. R. L. Produção de frutos e estolhos do morangueiro em diferentes sistemas de cultivo em ambiente protegido. **Bragantia**, v. 61, n. 1, p. 25-34, 2002.

FIGUEIREDO, F. C., BOTREL, P. P., TEIXEIRA, C. P., PETRAZZINI, L. L., LOCARNO, M., CARVALHO, J. D.. Pulverização foliar e fertirrigação com silício nos atributos físico-químicos de qualidade e índices de coloração do morango. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1306-1311, 2010.

FORNEY, C. F., SONG, J., HILDEBRAND, P. D., FAN, L., & MCRAE, K. B. Interactive effects of ozone and 1-methylcyclopropene on decay resistance and quality of stored carrots. **Postharvest biology and technology**, 45(3), p. 341-348. 2007.

FORSYTHE, S. J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. **Microbiologia da segurança alimentar. Artmed**, p. 164-168, 2002.

FRANCIS, F.J. The origin of tan-1 a/b. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 412, 1975.

FRANCO, G. **Tabelas de composição química dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 303p. 2002.

FREITAS-SILVA, O.; SOUZA, A. M.; OLIVEIRA, E. M. M. Potencial da ozonização no controle de fitopatógenos em pós-colheita. In: Luz, W. C. da. (org.). **Revisão anual de patologia de plantas**. 1.ed. Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, v.21, p.96-130. 2013.

GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; QUILES, J.L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v.28, p. 9.12, 2012.

GIORDANO, B. N. E. **Efeito do ozônio sobre a micoflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)**. Florianópolis: UFSC, 2009. 193p.

GUIA DE INTERPRETAÇÃO 3M DO BRASIL Ltda. **Placa para Contagem de Aeróbios**. 3M™ Petrifilm™. Disponível em <<http://multimedia.3m.com/mws/media/5868570/guia-interpr-petrefilm-ecoli-e-coliformes.pdf>> Acesso em 05 de janeiro de 2017.

GUIA DE INTERPRETAÇÃO 3M DO BRASIL Ltda. **Placa para Contagem de Bolores e Leveduras.** 3M™ Petrifilm™. Disponível em < http://solutions.3m.com.br/3MContentRetrievalAPI/BlobServlet?lmd=1401860880000&locale=pt_BR&assetType=MMM_Image&assetId=1361801702768&blobAttribute=ImageFile> Acesso em 05 de janeiro de 2017.

GUIA DE INTERPRETAÇÃO 3M DO BRASIL Ltda. **Placa para Contagem de E.coli e Coliformes.** 3M™ Petrifilm™. Disponível em < <http://multimedia.3m.com/mws/media/5868570/guia-interpr-petrefilm-ecoli-e-coliformes.pdf>> Acesso em 05 de janeiro de 2017.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Swiss Society of Food Science and Technology**. Published by Elsevier Ltd. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 37, p. 453–460. 2004.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P. Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria Ananassa* Duch) cv IAC Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 231-233, 1999.

HENRIQUES, A. T.; BASSANI, V. L.; RASEIRA, M. do C.; ZUANAZZI, J. A. Antocianos e capacidade antioxidante de frutas. In: Simpósio Nacional do Morango, 2., Encontro De Pequenas Frutas E Frutas Nativas, 1., 2004, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.271-282, 2004.

HOLTZ, S. G. **Aplicação de ozônio e de revestimentos comestíveis em morangos (Fragaria ananassa Duch.) minimamente processados.** Dissertação (mestrado). 93 f. Universidade Federal de Viçosa. 2006.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4ed. Brasília: ANVISA, Ministério da Saúde, 1018 p. 2005.

IKEURA, H.; HAMASAKI, S.; TAMAKI, M. Effects of O₃ microbubble treatment on removal of residual pesticides and quality of persimmon leaves. **Food Chemistry**, v.138, p.366-71, 2013.

JACQUES, A. C., ZAMBIAZI, R. C., GANDRA, E. Á., KRUMREICH, F., SUZANE, R. D. L., MACHADO, M. R. G. Sanitização com produto à Base de Cloro e com Ozônio: Efeito Sobre Compostos Bioativos de Amora-preta (*Rubus fruticosus*) cv. Tupy. **Revista Ceres**, 62(6), p. 507-515. 2015.

KECHINSKI, C. P. **Avaliação do uso de ozônio e de outros tratamentos alternativos para a conservação do mamão papaia (Carica papaya L.)**, 125 f. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande Sul. 2007.

KHADRE, M. A., YOUSEF, A. E. Decontamination of a multilaminated aseptic food packaging material and stainless steel by ozone. **Journal of Food Safety**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2001.

- KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J.G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v.66, n.9, p.1242-1252, 2001.
- KIM, J. G.; YOUSEF A. E.; CHISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on Lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 17-37, 1999a.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 9, p. 1071-1087, 1999b.
- LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. **Ozone in water treatment: application and engineering**. Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers, 568 p.1991.
- LITTLE, A. Off on a tangent. **Journal of Food Science**, v.40, p.410-411, 1975.
- LUCENA, E. M. P. de. **Desenvolvimento e maturidade fisiológica de manga "Tommy Atkins" no vale do São Francisco**. 152 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, 2006.
- MASKAN, M. Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. **Journal of Food Engineering**, v.48, p.169-175, 2001.
- MCLELLAN, M. R.; LIND, L. R.; KIME, R. W. Hue angle determinations and statistical analysis for multiquadrant hunter L, a, b data. **Journal of Food Quality**, v.18, n.3, p.235-240, 1995.
- MENDEZ, F.; MAIER, D. E.; MASON, L. J.; WOLOSHUK, C. P. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.33-44, 2003.
- METCALF e EDDY. **Wastewater Engineering**. 3ed. Treatment, disposal, reuse, Mc Graw – Hill International Editions, 349 p. 1991.
- MLIKOTA-GABLER, F. ; SMILANICKB, J. L. ; MANSOURB, M. F.; KARACA, H. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, n. 2, p. 85-90, 2010.
- MONACO, K. de A. **Influência da sanitização e do armazenamento nos compostos bioativos de manga 'palmer' in natura e processada**. Tese (Doutorado). 142 f. Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho". 2015.
- NADAS, A.; OLMO, M.; GARCÍA, J. M. Growth of *Botrytis cinerea* and strawberry quality in ozone enriched atmospheres. **Journal of Food Science**, v.68, n.5, p. 1798-1802, 2003.
- NASCIMENTO, M.S.; SILVA, N. Tratamentos químicos na sanitização de morango (*Fragaria vesca* L). **Brazilian Journal of Food Technology**.v.13, n.1, p.11-17. 2010.

NOTERMANS, S.; ZNADVOORT-ROELOFSEN, J. S. V.; BARENDZ, A. W.; BECZNER, J. Risk profile for strawberries. **Food Protection Trends**.v.24, n.10, p.730-739, 2004.

NOVAES, S. F. D., CONTE-JUNIOR, C. A., FRANCO, R. M., & MANO, S. B. Influência das novas tecnologias de conservação sobre os alimentos de origem animal. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 9(19), p. 1-21. 2012.

NOVAK, J.S.; YUAN, J.T.C. **The ozonation concept: advantages of ozone treatment and commercial developments**. In: Tewari, G.; Juneja, V.K. (Eds.) *Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation*. Ames: Blackwell Publishing, 2007, p.185-193.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Editora Manole Ltda, 2006.

OLIVEIRA, A. B. A. D., PAULA, C. D., CAPALONGA, R., CARDOSO, M. D. I., TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev HCPA**, 30(3), p. 279-85. 2010.

PALOU L. SMILANICK, J.L. CRISOSTO, C.H. MANSOUR, M. Effect of Gaseous Ozone Exposure on the Development of Green and Blue Molds on Cold Stored Citrus Fruit. **Plant Disease**. v. 85, n. 6. p. 632-638, 2001.

PALOU, L.; CRISOSTOA, C. H.; SMILANICKB, J. L.; ADASKAVEGC, J. E.; ZOFFOLI, J. P. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. **Postharvest biology and technology**, v. 24, n. 1, p. 39-48, 2002.

PASCUAL, A.; LLORCA, L.; CANUT, A. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.S29-S35, 2007.

PIRANI, S. Application of ozone in food industries. Doctoral Program in Animal **Nutrition and Food Safety**, 133 f. Università degli Studi di Milano. 2011.

PONCE, A.; BASTIANI, M.; MINIM, V.; VANETTI, M. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.01, p. 113-118, 2010.

PROTEGGENTE, A.R.; PANNALA, A.S.; PAGANGA, G.; VAN BUREN, L.; WAGNER, E.; WISEMAN, S.; VAN DE PUT, F.; DACOMBE, C.; RICE-EVANS, C.A. The antioxidant activity of regularly consumed fruits and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radical Research**, v.36, p.217–233, 2002.

PUIA, C.; OROIAN, I.; FLORIAN, V. Effect of Ozone Exposure on Phytopathogenic Microorganisms on Stored Apples. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 15, p 9-13, 2004.

RADIN, B.; LISBOA, B.B.; WITTER, S.; BARNI, V.; REISSER JUNIOR, C.; MATZENAUER, R.; FERMINO, M.H. Desempenho de quatro cultivares de morangueiro em duas regiões climáticas do Rio Grande do Sul. **Horticultura Brasileira**, v.29, p.287-291, 2011.

RAHMAN, M. M; MONIRUZZAMAN, M.; AHMAD, M. R.; SARKER, B. C.; ALAM, K. M. Maturity stages affect the postharvest quality and shelf-life of fruits of strawberry genotypes growing in subtropical regions. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. p. 10, 2014.

RICE, R. G.; ROBSON, C. M.; MILLER, G. W.; HILL, A. B. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, v.73, p.44-47, 1981.

RICE, R.G. **Application of ozone in water and wastewater treatment**. In: RICE, R.G. et al. Analytical aspects of ozone: treatment of water and wastewater. Chelsea, MI: Lewis, 1996. p. 7-26.

ROCHA, D.A.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, C.D.; FONSECA, E.W.N. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.4, p.1124-1128, 2008.

RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826p.

SALVADOR, A.; ABAD, I.; ARNAL, L.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M. Effect of Ozone on Postharvest Quality of Persimmon. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, pp. S443-S446(1). 2006

SANTOS, R. R. **Ozônio como agente fungicida e seu efeito na qualidade do arroz (*Oryza sativa* L.)**. Dissertação (mestrado). 56 f. Universidade Federal de Viçosa 2014.

SAVI, G.D.; PIACENTINI, K.; BITTENCOURT, K.O.; SCUSSEL, V.M. Ozone treatment efficiency on *F. graminearum* & deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains quality and germination, **Journal of Stored Products**, in press, 2014.

SELMA, M.; BELTRAN, D.; ALLENDE, A.; GIL, M. I. Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. **Food Microbiology**, v.24, p.492-499, 2007.

- SELMA, M.V.; IBÁÑEZ, A.M.; ALLENDE, A.; CANTWELL, M.; SUSLOW, T. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. **Food Microbiology**, v.25, p.162–168, 2008.
- SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; KOZAKIEWICZ, Z.; VENANCIO, A.; LIMA, N. Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 12, p. 2355 - 2358, 2003.
- SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C., et. al. Botânica e Fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, vol. 28, n. 236, p. 7-13, jan.-fev. 2007.
- SILVA, JR., E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001.
- SILVA, M. R. et al. **Leite: possibilidades de um grande alimento no promoção da segurança alimentar**. In: YAMAGUCHI, Luis Carlos Takao, et al (Ed.). *Pecuária de leite: novos desafios*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, cap.4. p 71–72. 2005.
- SIMÃO, R.; RODRÍGUEZ, T. D. M. Utilização do ozônio no tratamento pós-colheita do tomate (*Lycopersicon esculentum* mill). **Revista de Estudos Sociais**, v. 11, n. 22, p. 115-124, 2009.
- SIMÕES, R. D. O. **Processo de ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de goiabas Pedro Sato**. Tese de doutorado. 147 f. Universidade Federal de Viçosa. 2012.
- SIRVETA. **Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por los alimentos**. 2002. Disponível em <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/report_eta01.asp> Acesso em: 29 de dezembro de 2016.
- SIVAPALASINGAM, S.; FRIEDMAN, C.R.; COHEN, L.; TAUXE, R.V. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, v.67, n.10, p.2342-2353, 2004.
- SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.
- STROHECKER, R.; HENNING, H.M. **Análises de vitaminas: métodos comprovados**, Madrid: Paz Montolvo, 1967. 428 p.
- STUCKI, S.; SCHULZE, D.; SCHUSTER, D.; STARK, C. Ozonization of purified water systems. **Pharmaceutical Engineering**, v. 25, n.1, p.1-7, 2005.

SUSLOW, T.V. **Ozone applications for postharvest disinfection of edible horticultural crops**. Oakland: University of California - Division of Agriculture and Natural Resources, 2004. Publication 8133, 8p.

TIWARI, B. K.; BRENNAN, C. S.; CURRANA, T.; GALLAGHER, E.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Application of ozone in grain processing. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 3, p. 248-255, 2010.

TIWARI, B. K. MUTHUKUMARAPPAN, K.; O'DONNELL, C. P.; CULLEN, P. J. Kinetics of freshly squeezed orange juice quality changes during ozone processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6416-6422, 2008.

TORRES, E. A. F. S.; REGÊ FERREIRA, A. F.; RÍMOLI, C. D. Estudo das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 42, p. 18-23, 1996.

VANETTI, M. C. D. Segurança microbiológica em produtos minimamente processados. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE PROCESSAMENTO MINIMO DE FRUTAS E HORTALIÇAS, 3., 2004, Viçosa, MG. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004. p. 30-32.

VICTORIN, K. Review of genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, v.277, p.221-238, 1992.

WU, J.; DOAN, H.; CUENCA, M. A. Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.81, n.7, p.1288-1293, 2006.

YEOH, W. K.; ALI, A.; FORNEY, C. F. Effects of ozone on major antioxidants and microbial populations of fresh-cut papaya. **Postharvest Biology and Technology**, v. 89, p. 56-58, 2014.

YUK, H. G.; YOO, M. Y.; YOON, J. W.; MARSHALL, D. L.; OH, D. H. Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on enoki mushroom. **Food Control**, v.18, p.548-553, 2007.