



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFICÁCIA DA ÁGUA OZONIZADA NO CONTROLE DE  
MICRORGANISMOS EM MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.)  
E EFEITO NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DURANTE O  
ARMAZENAMENTO**

**WALLAS FELIPPE DE SOUZA FERREIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA/DF**

**FEVEREIRO/2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFICÁCIA DA ÁGUA OZONIZADA NO CONTROLE DE  
MICRORGANISMOS EM MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.)  
E EFEITO NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DURANTE O  
ARMAZENAMENTO**

**WALLAS FELIPPE DE SOUZA FERREIRA**

**ORIENTADOR: Dr. ERNANDES RODRIGUES DE ALENCAR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA**

**PUBLICAÇÃO: 125/2017**

**BRASÍLIA/DF  
FEVEREIRO/2017**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFICÁCIA DA ÁGUA OZONIZADA NO CONTROLE DE  
MICRORGANISMOS EM MORANGO (*Fragaria x ananassa* Duch.)  
E EFEITO NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DURANTE O  
ARMAZENAMENTO**

**WALLAS FELIPPE DE SOUZA FERREIRA**

**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. Professor Adjunto UnB – FAV  
(Orientador)**

---

**MÁRCIA DE ÁGUIAR FERREIRA, Dra. Professora Adjunto UnB – FAV  
(Examinador Interno)**

---

**STHER MARIA LENZA GRECO, Dra. Professora Adjunto IFB – Instituto  
Federal de Brasília  
(Examinador Externo)**

**BRASÍLIA/DF, 21 DE FEVEREIRO DE 2017**

## FICHA CARTOGRÁFICA

Ferreira, Wallas Felipe de Souza

Eficácia da água ozonizada no controle de microrganismos em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) e efeito na qualidade físico-química durante o armazenamento./ Wallas Felipe de Souza Ferreira; orientação de Ernandes Rodrigues de Alencar. – Brasília, 2017.

128 p.:il.

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

1. Ozonização. 2. Morango. 3. Propriedades físico-químicas e microbiológicas

Ernandes, R. A. Ph.D

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

FERREIRA, W. F. S. **Eficácia da água ozonizada no controle de microrganismos em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) e efeito na qualidade físico-química durante o armazenamento.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 128p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

**AUTOR:** Wallas Felipe de Souza Ferreira

**TÍTULO:** Eficácia da água ozonizada no controle de microrganismos em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) e efeito na qualidade físico-química 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: Wallas Felipe de Souza Ferreira  
E-mail: wallasfelippe@gmail.com

## DEDICATÓRIA

*“A grandeza do homem está em superar as condições que lhe são adversas. Quando, pela sua mente, munido apenas do pensamento, penetra no que há de mais profundo, invade o que se lhe oculta aos olhos, e consegue descobrir os nexos das causas remotas e da causa primeira de todas as coisas, descobre ele que há uma fonte de todas as coisas que, pela sua eminência e pelo seu imenso valor, ele respeita e ama. Só quando o homem consegue elevar-se acima da sua contingência e alcançar esse ser supremo, e humildemente lhe presta a homenagem que ele merece, então o homem consegue ultrapassar os seus próprios limites, porque no mesmo instante em que os vence, ele supera a si mesmo.”*

Mário Ferreira dos Santos – Filosofias da Afirmção e da Negação

*Para meu pai Eguimar Ferreira (in memoriam),  
por todos os sonhos que ele não foi capaz de ver  
realizados.*

*Para minha querida namorada Isabele Caroline  
que, acima de tudo, é minha melhor amiga.*

*Para todos os meus familiares e amigos!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem o Seu controle e direção nada disso seria possível.

À memória do meu pai, Eguimar Ferreira, pelo apoio que me deu em vida e por me ensinar o gosto de aprender e de buscar sempre a verdade.

À minha mãe, Aparecida do Carmo, que sempre acreditou em mim e sempre me apoiou.

À minha namorada, Isabele Caroline, pelo companheirismo, pela ajuda realizada nessa pesquisa, por sempre compartilhar sonhos ao meu lado e me dar o apoio necessário para nunca desistir.

Ao professor Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar, pelas oportunidades, amizade e por confiar responsabilidades que ajudaram no meu crescimento profissional.

Ao meu irmão, William Felipe, e meu primo, Douglas Ferreira, pelo companheirismo e ajuda para cuidar do Otto quando eu não estava presente.

Ao Alexandre Fukushi, seu pai João Fukushi e à sua família por terem aberto as portas de sua propriedade rural e nos terem concedido material para realização deste trabalho.

À professora Márcia Ferreira pela ajuda e por disponibilizar o laboratório e os equipamentos para realização de diversas etapas deste trabalho.

Aos amigos de laboratório: Márcio Mendonça e Jaqueline Lamounier, pela paciência e pelos valiosos ensinamentos, pois sem eles a realização deste trabalho seria muito mais difícil.

Aos amigos músicos da Mirror of God, por serem compreensíveis nos momentos em que não era possível ensaiar, mas por sempre compartilharem o verdadeiro amor à música ao meu lado.

À memória e obra do filósofo brasileiro Mário Ferreira dos Santos, um dos maiores filósofos do século XX, porém esquecido pela própria nação; sua obra tem me ensinado a verdadeira contemplação e busca pela verdade.

Àqueles que ajudaram na realização deste trabalho, estudantes de graduação, pós-graduação e orientandos do professor Ernandes.

À Universidade de Brasília (UnB), Programa de pós-graduação em agronomia pelo apoio institucional e por todos os seus professores que compartilharam de alguma forma seus conhecimentos e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos, ao CNPq e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio financeiro.

A todos os amigos e familiares que acreditaram em mim e ajudaram-me na realização deste trabalho:

*Muito obrigado!*

## CIRCUMSTANCES

A boy alone, so far from home  
Endless rooftops from my window  
I felt the gloom of empty rooms  
On rainy afternoons

Sometimes in confusion  
I felt so lost and disillusioned  
Innocence gave me confidence  
To go up against reality

*All the same, we take our chances  
Laughed at by Time  
Tricked by Circumstances  
Plus ça change  
Plus c'est la meme chose  
The more that things change  
The more they stay the same*

Now I've gained some understanding  
Of the only world that we see  
Things that I once dreamed of  
Have become reality

These walls that still surround me  
Still contain the same old me  
Just one more who's searching for  
A world that ought to be\*

***Rush* - Geddy Lee, Alex Lifeson e Neil Peart (Hemispheres - 1978).**

(\*Tradução: *Um garoto sozinho, tão longe de casa/Telhados intermináveis da minha janela/Senti a melancolia de quartos vazios em tardes chuvosas/Às vezes na confusão senti-me tão perdido e desiludido/Inocência me deu confiança de ir contra a realidade/Tudo igual, aproveitamos nossas chances zombados pelo Tempo enganados pelas Circunstâncias/Quanto mais mudanças/Mais é a mesma coisa/Quanto mais as coisas mudam/Mais elas permanecem as mesmas/Agora que ganhei um pouco de entendimento do único mundo que vemos/Coisas com as quais uma vez sonhei tornaram-se realidade/Essas paredes que ainda me cercam ainda contém o mesmo eu antigo/Apenas mais um que está em busca de um mundo que deveria ser).*



# ÍNDICE GERAL

|  |       |
|--|-------|
| ÍNDICE GERAL .....   | viii  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | xii   |
| ÍNDICE DE TABELAS .....  | xv    |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....   | xviii |
| RESUMO GERAL .....   | xx    |
| ABSTRACT .....   | xxii  |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL .....  | 1     |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....   | 3     |
| 2.1 Morango ( <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).....                         | 3     |
| 2.1.1 Botânica do Morangueiro .....  | 3     |
| 2.1.2 Produção .....   | 4     |
| 2.1.3 Valor Nutricional .....  | 6     |
| 2.1.4 Contaminação dos morangos.....   | 7     |
| 2.2 Ozônio.....  | 8     |
| 2.2.1 Histórico .....  | 8     |
| 2.2.2 Propriedades físico-químicas do Ozônio.....                            | 10    |
| 2.2.3 Características do Ozônio em meio aquoso.....                          | 12    |
| 2.2.4 Segurança do Trabalho na aplicação do Ozônio .....                     | 13    |
| 2.2.5 Ozonização como alternativa à Cloração na Sanitização do morango ..... | 15    |
| 2.2.6 Análise Econômica .....  | 16    |
| 2.3 Qualidade Microbiológica de morangos .....                               | 17    |
| 2.3.1 Microrganismos de Interesse .....                                      | 18    |
| 2.4 Parâmetros utilizados na avaliação da qualidade físico-química.....      | 22    |
| 2.4.1 Sólidos Solúveis Totais .....  | 22    |
| 2.4.2 Acidez Total Titulável .....   | 23    |

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| 2.4.3           | pH .....  | 23 |
| 2.4.4           | Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT) ...    | 24 |
| 2.5             | Ozônio como Sanitizante em morango .....                                  | 24 |
| 3.              | REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....  | 27 |
| CAPÍTULO I..... |   | 42 |
| RESUMO .....    |   | 43 |
| ABSTRACT .....  |   | 45 |
| 1.              | INTRODUÇÃO .....  | 47 |
| 2.              | MATERIAL E MÉTODOS .....  | 49 |
| 2.1             | Origem e tratamento prévio das amostras.....                              | 49 |
| 2.2             | Geração do gás ozônio .....   | 49 |
| 2.3             | Obtenção da água ozonizada.....   | 50 |
| 2.4             | Quantificação do ozônio dissolvido na água .....                          | 50 |
| 2.5             | Tratamento dos morangos com água ozonizada .....                          | 51 |
| 2.6             | Análises microbiológicas dos morangos.....                                | 51 |
| 2.6.1           | Preparo das diluições seriadas das amostras de morango.....               | 51 |
| 2.6.2           | Detecção de microrganismos utilizando o sistema Petrifilm™ .....          | 52 |
| 2.6.2.1         | Contagem de Coliformes totais e <i>E. coli</i> (Petrifilm™ EC 6404) ..... | 52 |
| 2.6.2.2         | Contagem de Aeróbios Mesófilos (Petrifilm™ AC).....                       | 52 |
| 2.6.2.3         | Contagem de Bolores e Leveduras (Petrifilm™ YM).....                      | 52 |
| 2.6.2.4         | <i>Salmonella</i> spp.....  | 53 |
| 2.7             | Avaliação da qualidade físico-química dos morangos .....                  | 53 |
| 2.7.1           | Perda de Massa Fresca (PMF).....  | 53 |
| 2.7.2           | Potencial Hidrogênionico (pH).....  | 53 |
| 2.7.3           | Acidez Total Titulável .....  | 54 |
| 2.7.4           | Sólidos Solúveis Totais (SST).....  | 54 |
| 2.7.5           | Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT) ...    | 54 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.7.6   | Coloração dos Morangos .....   | 54 |
| 2.8     | Delineamento Experimental .....  | 55 |
| 3.      | RESULTADOS .....   | 56 |
| 4.      | DISCUSSÃO .....  | 67 |
| 5.      | CONCLUSÕES .....   | 70 |
| 6.      | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 71 |
|         | CAPÍTULO II .....  | 75 |
|         | RESUMO .....   | 76 |
|         | ABSTRACT .....   | 77 |
| 1.      | INTRODUÇÃO .....   | 78 |
| 2.      | MATERIAL E MÉTODOS .....   | 81 |
| 2.1     | Origem e tratamento prévio das amostras .....  | 81 |
| 2.2     | Geração do gás ozônio .....  | 81 |
| 2.3     | Obtenção da água ozonizada .....   | 82 |
| 2.4     | Quantificação do ozônio dissolvido na água .....                                       | 82 |
| 2.5     | Tratamento dos morangos com água ozonizada .....                                       | 82 |
| 2.6     | Análises microbiológicas dos morangos .....  | 83 |
| 2.6.1   | Preparo das diluições seriadas das amostras de morango .....                           | 83 |
| 2.6.2   | Detecção de microrganismos utilizando o sistema Petrifilm <sup>TM</sup> .....          | 84 |
| 2.6.2.1 | Contagem de Coliformes totais e <i>E. coli</i> (Petrifilm <sup>TM</sup> EC 6404) ..... | 84 |
| 2.6.2.2 | Contagem de Aeróbios Mesófilos (Petrifilm <sup>TM</sup> AC) .....                      | 84 |
| 2.6.2.3 | Contagem de Bolores e Leveduras (Petrifilm <sup>TM</sup> YM) .....                     | 84 |
| 2.6.2.4 | <i>Salmonella</i> spp. ....  | 84 |
| 2.7     | Avaliação da qualidade físico-química dos morangos .....                               | 85 |
| 2.7.1   | Perda de Massa Fresca (PMF) .....  | 85 |
| 2.7.2   | Potencial Hidrogênionico (pH) .....  | 85 |
| 2.7.3   | Acidez Total Titulável .....   | 85 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 2.7.4 | Sólidos Solúveis Totais (SST).....   | 86  |
| 2.7.5 | Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT) ...                               | 86  |
| 2.7.6 | Coloração dos Morangos .....   | 86  |
| 2.8   | Delineamento Experimental .....  | 87  |
| 3.    | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 88  |
| 3.1   | Avaliação da eficiência da água ozonizada no controle de microrganismos em morangos armazenados..... | 88  |
| 3.2   | Variáveis qualitativas dos morangos armazenados.....   | 91  |
| 4.    | CONCLUSÃO .....  | 100 |
| 5.    | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 101 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de formação do Ozônio ( $O_3$ ) a partir de moléculas de Oxigênio ( $O_2$ ). Fonte: Elaborado pelo autor. .... 11

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Representação esquemática do princípio de geração do gás ozônio baseada no método DBD – Descarga por Barreira Dielétrica. Fonte: Elaborado pelo autor. .... 50

Figura 2 – Contagem de aeróbios mesófilos log (UFC  $g^{-1}$ ) em (A) Morangos imersos em água com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C. (B): Morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C. .... 56

Figura 3 – Contagem de bolores e leveduras log (UFC  $g^{-1}$ ) (A) Morangos imersos por 5 minutos em água apenas com pH alterado (testemunhas) e armazenados a 5 °C. (B): Morangos imersos por 5 minutos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C. .... 58

Figura 4 – Curva de regressão referente à perda de massa fresca (%) em morangos em função do período de armazenamento de morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C. .... 59

Figura 5 – Curva de regressão referente ao pH de morangos submetidos ou não à água ozonizada no período de armazenamento. .... 60

Figura 6 – Sólidos solúveis totais (°Brix) em (A) morangos imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C. (B) Morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C. .... 61

Figura 7 – Acidez Total Titulável (% de ácido cítrico) em morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C. .... 62

Figura 8 – Relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT) em morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada e armazenados a 5 °C. .... 63

|   |    |
|---|----|
| Figura 9 – Curva de regressão referente à saturação de cor (C) em polpa de morangos em função do período de armazenamento. ....   | 64 |
| Figura 10 – Tonalidade de cor ( $h^\circ$ ) em polpa de morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C. .... | 65 |
| Figura 11 – Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C. .... | 66 |
| <b>CAPÍTULO II</b>  |    |
| Figura 1 – Gerador de ozônio Modelo O&L 3.0-O2 RM. Fonte: Arquivo pessoal. ....   | 82 |
| Figura 2 – Contagem de aeróbios mesófilos log (UFC g <sup>-1</sup> ) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. ....  | 88 |
| Figura 3 – Contagem de bolores e leveduras log (UFC g <sup>-1</sup> ) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. ....   | 90 |
| Figura 4 – Perda de Massa (%) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. ....   | 92 |
| Figura 5 – pH de morangos submetidos a dois tempos de imersão em água ozonizada em duas diferentes concentrações e armazenados a 5 °C. ....   | 93 |
| Figura 6 – Teor de Sólidos Solúveis Totais (°Brix) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. ....  | 94 |
| Figura 7 – Curva de regressão referente à acidez total titulável (% ácido cítrico) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. ....  | 95 |
| Figura 8 – Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. ....   | 96 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 9 – Saturação de cor (C) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.....             | 97 |
| Figura 10 – Tonalidade de cor (h°) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.....          | 98 |
| Figura 11 – Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... | 99 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Composição nutricional média do morango (g/100g) .....  | 6  |
| Tabela 2 – Diferentes agentes oxidantes e os respectivos potenciais de oxidação.....   | 12 |
| Tabela 3 – Solubilidade do gás ozônio em meio aquoso de acordo com a temperatura.  | 12 |
| Tabela 4 – Referência dos Níveis de Exposição para Ozônio. ....  | 14 |
| Tabela 5 – Comparação das características dos processos de cloração e ozonização. -, nenhum; +, baixo; ++, médio; +++, alto..... | 16 |

## CAPÍTULO I

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) referentes à contagem de aeróbios mesófilos em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C. ....                                    | 57 |
| Tabela 2 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) referentes à contagem de bolores e leveduras em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C. ....                                   | 58 |
| Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão referentes à perda de massa fresca de morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C.....  | 60 |
| Tabela 4 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) referentes ao teor de sólidos solúveis totais (°Brix) em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C.....                           | 61 |
| Tabela 5 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) referentes à acidez total titulável em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C .....  | 62 |
| Tabela 6 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> ) referentes à relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT) em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C..... | 63 |



Tabela 7 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à Tonalidade de cor ( $h^\circ$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C ..... 65

Tabela 8 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C ..... 66

## **CAPÍTULO II**

Tabela 1 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à contagem de aeróbios mesófilos em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 89

Tabela 2 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à contagem de bolores e leveduras em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 90

Tabela 3 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à perda de massa (%) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 92

Tabela 4 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes ao pH de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. .... 94

Tabela 5 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes ao teor de Sólidos Solúveis Totais (°Brix) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. .... 94

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão referentes à acidez titulável de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 95

Tabela 7 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 96

Tabela 8 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à Saturação de cor (C) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 97

Tabela 9 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à Tonalidade de cor ( $h^\circ$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 98

Tabela 10 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C..... 99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| ANVISA                        | Agência Nacional de Vigilância Sanitária             |
| AOAC                          | Association of Official Analytical Chemists          |
| CSC                           | California Strawberry Commission                     |
| CMCC                          | The California Minor Crops Council                   |
| CEO                           | Compagnie des Eaux et de l'Ozone                     |
| DBD                           | Descarga por Barreira Dielétrica                     |
| EC                            | <i>E. coli</i>                                       |
| EFSA                          | European Food Safety Authority                       |
| EPA                           | Environmental Protection Agency                      |
| FAO                           | Food and Agricultural                                |
| FDA                           | Food and Drug Administration                         |
| GRAS                          | Generally Recognized as Safe                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Água oxigenada                                       |
| KI                            | Iodato de Potássio                                   |
| mg                            | Miligrama  |
| min                           | Minuto   |
| mL                            | Mililitro  |
| NaCl                          | Cloreto de Sódio                                     |
| NaOH                          | Hidróxido de Sódio                                   |
| NIOSH                         | National Institute of Occupational Safety and Health |

|      |   |
|------|---|
| NR   | Norma Reguladora                                |
| OH   | Radical Hidroxila                               |
| OSHA | Administração de Saúde e Segurança Ocupacional  |
| PMF  | Perda de Massa Fresca                           |
| ppm  | Partes por milhão                               |
| SST  | Sólidos solúveis totais                         |
| UFC  | Unidades Formadoras de Colônia                  |
| USDA | Us Department of Agriculture, Research Service. |

## RESUMO GERAL

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do gás ozônio dissolvido na água, em diferentes condições e combinações, sobre microrganismos deteriorantes e patogênicos e possíveis efeitos na qualidade físico-química do morango armazenado. Foram realizados dois experimentos no presente trabalho: no primeiro experimento avaliou-se a influência do pH na eficiência da água ozonizada em controlar microrganismos e possíveis alterações na qualidade físico-química do morango armazenado; no segundo experimento avaliou-se a eficiência da água ozonizada em diferentes combinações de concentração e tempo de imersão no controle de microrganismos e possíveis alterações na qualidade físico-química do morango armazenado. Foram utilizados morangos da variedade “Portola” adquiridos de um produtor da região administrativa de Brazlândia – Distrito Federal. Para avaliar a influência do pH na água ozonizada, os morangos foram divididos em seis lotes, três lotes em que o gás ozônio foi dissolvido na água na concentração de 21 mg L<sup>-1</sup> por 15 min de borbulhamento e três lotes em que não foram ozonizados, correspondendo aos tratamentos: água destilada ozonizada com pH 3,0 e concentração de ozônio na água de 0,11 mg L<sup>-1</sup>, água destilada ozonizada com pH 6,5 e concentração de ozônio na água de 0,08 mg L<sup>-1</sup>, água destilada ozonizada com pH 8,7 e concentração de ozônio na água de 0,04 mg L<sup>-1</sup>; os outros três tratamentos foram testemunhas, águas destiladas com pH's 3,0, 6,5 e 8,7. Para se chegar ao valor de pH 3,0 utilizou-se ácido cítrico e para o valor de pH 8,7 utilizou-se bicarbonato de sódio, o pH 6,5 não foi alterado. O tempo de imersão em todos os tratamentos foi de 5 min. Após essa etapa os morangos foram armazenados em câmara fria a 5 °C. As análises dos frutos foram realizadas no dia da ozonização (tempo zero) e a cada dois dias até o dia seis de armazenamento. Na etapa microbiológica foi avaliado a presença de *Salmonella* spp., coliformes totais, *E. coli*, bolores e leveduras e aeróbios mesófilos, todos expressos em log (UFC g<sup>-1</sup>). As variáveis qualitativas avaliadas foram: perda de massa fresca, pH, acidez total titulável, teor de sólidos solúveis, relação SST/ATT e coloração. Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial 6x4, sendo seis tratamentos e quatro períodos de armazenamento (0, 2, 4 e 6), com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância e posteriormente análise de regressão. Verificou-se que o pH influenciou a eficiência da água ozonizada no controle de microrganismos indesejáveis em morangos durante o armazenamento. No que se refere à qualidade físico-química dos morangos, a água ozonizada foi capaz de retardar

a perda de massa fresca, manter os níveis de pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, relação SST/ATT e das variáveis referentes à cor. Para avaliar a eficiência da água ozonizada em diferentes concentrações e com tempo de imersão de 7,5 min, segundo experimento, os morangos foram divididos em três lotes: gás ozônio dissolvido em água na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> e borbulhado por 40 min, gás ozônio dissolvido em água na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> e, por fim, o último lote não foi submetido à imersão em água ozonizada. Em seguida os morangos foram armazenados em câmara fria a 5 °C. As análises dos frutos foram realizadas no dia da ozonização (tempo zero) e a cada três dias até o dia nove de armazenamento. As etapas de análises microbiológicas e qualidade físico-química dos morangos foram idênticas às do primeiro experimento. Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial 3x4, sendo três tratamentos e quatro períodos de armazenamento (0, 3, 6 e 9), com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância e posteriormente análise de regressão. A água ozonizada foi eficiente no controle de microrganismos, principalmente no que se refere a aeróbios mesófilos. Em relação à qualidade físico-química dos morangos armazenados, a água ozonizada não afetou expressivamente a perda de massa fresca, pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, relação SST/ATT e variáveis referentes à cor. Concluiu-se, a partir dos resultados obtidos nos dois experimentos, que a utilização de água ozonizada pode tornar-se um método promissor no controle de microrganismos e na manutenção da qualidade físico-química de morangos armazenados.

**Palavras-chave:** *Ozônio; Microrganismos patogênicos; Microrganismos deteriorantes; Alterações qualitativas.*

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of ozone gas dissolved in water under different conditions and combinations on deteriorating and pathogenic microorganisms and possible effects on the physical-chemical quality of the stored strawberry. Two experiments were carried out in the present work: the first experiment evaluated the influence of pH on the ozonated water efficiency in controlling microorganisms and possible changes in the physical-chemical quality of the stored strawberry; In the second experiment the efficiency of the ozonated water in different combinations of concentration and time of immersion in the control of microorganisms and possible changes in the physical-chemical quality of the stored strawberry were evaluated. Strawberries of the "Portola" variety were purchased from a producer in the administrative region of Brazlândia – Distrito Federal. To evaluate the influence of pH on ozonated water, strawberries were divided into six batches, three batches in which the ozone gas was dissolved in the water at a concentration of  $21 \text{ mg L}^{-1}$  for 15 min of bubbling and three batches in which were not ozonated, Corresponding to the treatments: ozonized distilled water with pH 3.0 and ozone concentration in water of  $0.11 \text{ mg L}^{-1}$ , ozonated distilled water with pH 6.5 and ozone concentration in water of  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$ , ozonated distilled water with pH 8.7 and ozone concentration in the water of  $0.04 \text{ mg L}^{-1}$ ; The other three treatments were control, distilled waters with pH's of 3.0, 6.5 and 8.7. In order to reach pH 3.0, citric acid was used and sodium bicarbonate was used for pH 8.7, pH 6.5 was not altered. The immersion time in all treatments was 5 min. After this stage the strawberries were stored in a cold room at  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . The fruits were analyzed on the day of ozonation (time zero) and every two days until day six of storage. In the microbiological stage, the presence of *Salmonella* spp., Total coliforms, *E. coli*, molds and yeasts and aerobes mesophiles, all expressed in  $\log (\text{UFC g}^{-1})$ , were evaluated. The qualitative variables evaluated were: fresh weight loss, pH, total titratable acidity, soluble solids content, ratio and staining. A completely randomized design was used in a 6x4 factorial scheme, with six treatments and four storage periods (0, 2, 4 and 6), with three replications. Initially, analysis of variance and regression analysis were performed. It was found that pH influenced the efficiency of ozonated water in the control of undesirable microorganisms in strawberries during storage. As regards the physico-chemical quality of strawberries, ozonated water was able to delay the loss of fresh mass, maintain pH levels, total soluble solids, titratable total acidity,

ratio and color variables. To evaluate the efficiency of the ozonated water at different concentrations and with an immersion time of 7.5 min, strawberries were divided into three lots: ozone gas dissolved in water at a concentration of 45 mg L<sup>-1</sup> and bubbled for 40 min, ozone gas dissolved in water at a concentration of 20 mg L<sup>-1</sup>, and lastly the last batch was not subjected to immersion in ozonated water. The strawberries were then stored in a cold room at 5 °C. The fruits were analyzed on the day of ozonation (zero time) and every three days until day nine of storage. The stages of microbiological analysis and physical-chemical quality of the strawberries were identical to those of the first experiment. A completely randomized design was used in a 3x4 factorial scheme, with three treatments and four storage periods (0, 3, 6 and 9), with three replications. Initially, analysis of variance and regression analysis were performed. The ozonated water was efficient in the control of microorganisms, especially with regard to aerobic mesophiles. Regarding the physico-chemical quality of the stored strawberries, the ozonated water did not significantly affect the loss of fresh mass, pH, total soluble solids, total titratable acidity, ratio and color variables. It was concluded from the results obtained in the two experiments that the use of ozonated water can become a promising method in the control of microorganisms and in the maintenance of the physico-chemical quality of stored strawberries.

**Keywords:** *Ozone; Pathogenic microorganisms; Deteriorating microorganisms; Qualitative changes.*



# 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de morango é de aproximadamente 4,52 milhões de toneladas, segundo dados da FAO (2014). Sendo que o Brasil contribui com uma produção de aproximadamente 133.000 toneladas (EMATER, 2011). A produção no Brasil distribui-se principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo e Distrito Federal. Destacando-se como uma das principais culturas olerícolas no contexto social e econômico do Distrito Federal, com uma área cultivada de aproximadamente 6.500 hectares/ano (FALCÃO, 2012).

Um dos principais problemas hoje no cultivo do morangueiro é o uso indiscriminado de químicos para o controle de pragas e doenças, o que pode provocar uma redução na qualidade do fruto ao apresentar resíduos químicos que constituem um risco à saúde humana e animal. Dados publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária mostraram que foram detectados cinco diferentes tipos de resíduos de ingredientes ativos irregulares no cultivo de morango (ANVISA, 2012). Esses fatores tem elevado a insatisfação dos consumidores quanto à qualidade final dos produtos *in natura*, o que provoca uma demanda crescente por produtos isentos de resíduos químicos, insetos e microrganismos, e que agradem ao paladar.

O morango, junto com o pimentão e o pepino, lidera o ranking dos alimentos mais contaminados, com a presença de resíduos de agroquímicos, acima do limite máximo permitido (OSHITA, 2012). É consumido predominantemente *in natura*, mas uma considerável quantidade é utilizada na indústria. Dentre os tratamentos que são aplicados a morangos *in natura* um dos principais e mais utilizados é o cloro e seus derivados; este é utilizado como agente sanificante, com o objetivo de garantir a conservação e a sanitização do produto até a chegada ao consumidor. Atualmente o cloro e seus derivados são os mais utilizados na higienização das frutas e hortaliças. No entanto, as principais desvantagens do processo de sanitização com cloro é a formação de subprodutos químicos mutagênicos em água e em alimentos (PRESTES, 2007; LAZAROVA et al., 1999; SILVA et al., 2011). Neste contexto, surge um agente sanitizante alternativo para uso em alimentos: o gás ozônio.

O ozônio é uma forma alotrópica de oxigênio; formado por uma molécula instável da adição de um átomo de oxigênio à molécula diatômica de oxigênio (O<sub>2</sub>). Os

primeiros experimentos com ozônio em alimentos começaram no início do século XX na Europa, onde seu uso se intensificou e se destacou mais na sanitização de águas pluviais e como um método alternativo à cloração. Desde 1982 é reconhecido com uma substância segura, e, alguns anos mais tarde, a utilização deste gás como aditivo direto em alimentos foi permitido pela FDA; o que possibilitou seu uso como agente antimicrobiano no tratamento e etapas de processamento como sanitizante em alimentos, destacando-se cada vez mais as pesquisas com este gás (RIDEAL, 1920; GRAHAM, 1997; KIM et al., 1999a; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; FDA, 2013).

O ozônio tem sido estudado como tecnologia alternativa ao cloro e possui um amplo espectro de ação, atuando sobre vírus, bactérias, fungos, leveduras e formas esporuladas (KIM et al., 1999b; KHADRE et al., 2001b; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; AGUAYO et al., 2006; ÖZTEKIN et al., 2006; WHANGCHAI et al., 2006; ALENCAR, 2009). Mesmo existindo diversos trabalhos utilizando o gás ozônio como sanitizante em alimentos é necessário um estudo mais aprimorado em estabelecer a eficiência da dose utilizada, o tempo de exposição e os custos de implantação/manutenção do sistema de produção, visando garantir a pureza microbiológica e a manutenção das características físico-químicas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia ao se utilizar água ozonizada em diferentes condições no controle de microrganismos em morango e efeito na qualidade físico-química durante o armazenamento.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)**

#### **2.1.1 Botânica do Morangueiro**

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta dicotiledônea, herbácea, estolonífera, perene, rasteira e pertence à família das Rosáceas, que inclui grande número de espécies de clima temperado. O gênero *Fragaria* foi proposto por Linneu em 1754, reunindo um grupo de plantas bastante variáveis quanto à funcionalidade e à estruturação (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1996; RONQUE, 1998).

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um híbrido resultante das espécies americanas *F. chiloensis*, *F. virginiana*, oriundas da América do Norte e do Chile. No século XIV, ambas eram plantadas lado a lado em jardins europeus, com finalidade ornamental e medicinal. O cruzamento entre essas duas espécies deu origem a *Fragaria x ananassa* Duch., ocorrido, provavelmente nas proximidades de Brest, na França, por volta de 1750. O híbrido resultante do cruzamento apresentou boas características em tamanho, cor e odor. Tornou-se assim o progenitor do morango que é cultivado até hoje, sendo a principal espécie e com maior importância econômica. Sua exploração comercial deu-se no início do século XIX (SANTOS, 1999; TOLEDO, 2003; CASTRO, 2004).

Segundo Lemaitre & Linden (1968) foram caracterizados, morfologicamente, quarenta cultivares de morangueiro da Bélgica e de países vizinhos, de diversos tipos e aspectos, constituindo critérios básicos de identificação dessas cultivares. Foram realizados estudos taxonômicos por Staudt em 1962 e 1989, onde foram tipificadas as espécies conhecidas do gênero *Fragaria* (QUEIROZ-VOLTAN et al., 1996).

O sistema radicular é composto pelas raízes primárias e secundárias; sendo que as raízes secundárias são constantemente renovadas a cada vez que morrem e podem atingir de 50 a 60 cm de profundidade. O sistema radicular é fasciculado e origina-se da coroa, além de apresentar a característica de crescerem principalmente nas épocas de dias curtos, dias em que a radiação solar é menor que 12 horas. É necessário utilizar cobertura plástica para elevar a temperatura do solo em épocas e regiões mais frias, favorecendo assim o crescimento radicular e o controle de doenças (RONQUE, 1998; SANHUENZA et al., 2005).

As flores do morangueiro geralmente são hipogínicas e andrógenas, mas em algumas cultivares as flores podem ser unissexuais. As inflorescências encontram-se agrupadas, apresentam um pedúnculo floral que é ereto e se curva após a polinização na formação do fruto. Após a fecundação os óvulos transformam-se em aquênios, estimulando o engrossamento do receptáculo, botanicamente denominado de pseudofruto ou infrutescência, ou seja, a parte comestível que chamamos de morango; já a parte do morango que popularmente é considerada como semente são os verdadeiros frutos, botanicamente denominados de aquênios (HENNION et al., 1997; DUARTE FILHO et al., 1999; RESENDE et al., 1999; SANHUENZA et al., 2005).

### **2.1.2 Produção**

A produção do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) se destaca em várias regiões do planeta, sendo sua maior predominância em regiões de clima temperado, como o Hemisfério Norte, cujo país com a maior produção mundial, com cerca de 1,37 milhões de toneladas em 2012, foi os Estados Unidos. Segundo dados da FAO (2014), a produção mundial de morango no ano de 2012 foi de aproximadamente 4,52 milhões de toneladas. No Brasil, a produção total de morango alcançada, em 2012, foi de aproximadamente 133 mil toneladas, ocupando uma área de aproximadamente 3.700 hectares. Cinco estados se destacam na produção brasileira de morango: Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo e Distrito Federal. Minas Gerais se destaca como maior produtor, sendo responsável por mais da metade da produção nacional, com 55% (RONQUE, 1998; SPECHT, 2009).

A cultura do morangueiro começou a desenvolver-se economicamente no Brasil no final da década de 1950, em Minas Gerais, onde foi se adaptando a diversos climas e solos até chegar ao Distrito Federal na década de 1960, através de produtores de origem japonesa vindos de São Paulo, que obtiveram relativo sucesso devido a altitude da região, cerca de 1.000 m acima do nível do mar, e condições climáticas favoráveis, com temperaturas mais altas no verão e inverno ameno e seco (FALCÃO, 2008; HENZ, 2010). Uma das principais atividades agrícolas realizadas no Distrito Federal é a olericultura, cuja área cultivada é de aproximadamente 6.500 hectares/ano, composta em grande parte por pequenos agricultores. O morango é uma das principais culturas no contexto social e econômico do Distrito Federal, pois é uma olerícola que possui um alto valor agregado e gera muita mão de obra. A produção de morango no DF no ano de

2011 foi de aproximadamente 6,5 mil toneladas (EMATER-DF, 2011; FALCÃO, 2012). Segundo Lopes et al., (2005), quando novas cultivares e técnicas foram introduzidas no Distrito Federal houve um aumento de produção e qualidade dos morangos, que permitiu a cultura do morangueiro tornar-se uma alternativa econômica atraente para aqueles que queriam produzir na região.

De maneira similar, Franquez (2008), relata que a introdução de novas cultivares nessas regiões produtoras do Brasil permitiu o aumento da produção e, consequência deste fator, tornaram o morangueiro uma cultura economicamente expressiva. As últimas cultivares dos Programas de Melhoramento do Brasil foram registradas em 1999, tais como: 'Campinas' (IAC 2712), 'Guarani' (IAC 5074), 'Monte Alegre' (IAC 3113), 'Princesa Isabel' (IAC 5277) pertencentes ao IAC; e, 'Santa Clara', 'Konvoy-Cascata', 'Vila Nova' pertencentes à Embrapa. Atualmente no Brasil as principais cultivares utilizadas são de programas de melhoramento de outros países, o que faz do Brasil dependente e vulnerável neste setor (OLIVEIRA e BONOW, 2012).

Antunes e Peres (2013) relatam que a cultivar Portola é ideal para o consumo *in natura*. Essa cultivar é adaptada à Costa Central e Sul da Califórnia, pois é originária da Universidade da Califórnia, resultado do cruzamento de Camino Real x Ventana. Possui fruto de cor semelhante à Ventana, forma cônica curta, coloração de polpa também semelhante à Ventana; época de colheita semelhante à Camarosa e Camino Real. Planta com vigor semelhante ao Camino Real, pois tem alto rendimento e mais compacto do que Ventana; moderadamente resistente a oídio, antracnose, podridão da coroa e murcha de *Verticillium*, porém, moderadamente suscetível à *Phytophthora* podridão da coroa, e da mancha comum; tolerância condicional ao ácaro rajado. A variedade Portola é uma cultivar de dia neutro muito produtivo em função do alto potencial de floração e da boa capacidade produtiva nos meses de verão. Por ter uma alta inflorescência e grande quantidade de frutos, deve-se tomar cuidado quanto à nutrição, pois exige uma adubação mais equilibrada, tendo o cuidado para não estimular uma planta mais vegetativa e os problemas com doenças provocados pelo excesso de nitrogênio.

Segundo Carvalho et al. (2012), a cultivar Portola possui qualidade superior a variedades de dias neutros como San Andreas, Monterey e Aromas, além de apresentar concentração de sólidos solúveis, teor de acidez desejável em torno de 0,8%, além de uma ótima relação SST/ATT e coloração vermelha mais intensa.

### 2.1.3 Valor Nutricional

Os morangos contêm fibras, carboidratos, proteínas, açúcares, minerais, vitaminas, além de ser uma rica fonte de compostos fitoquímicos, como os polifenóides, que atuam como agentes antioxidantes. Seus frutos são atrativos para o consumidor por apresentarem características próprias tais como cor, brilho, sabor, textura e odor. Os frutos do morangueiro também se destacam por possuírem fontes de compostos bioativos tais como: vitamina C, folato e compostos fenólicos; outras vitaminas também são encontradas: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina K, vitamina B6, Vitamina A e Vitamina E. Dentre esses fatores o morango é considerado atraente por tais características sensoriais e por sua composição nutricional (Tabela 1) (HENRIQUES et al., 2004; FRANCO, 2002; PROTEGGENTE et al., 2002; GIAMPIERI et al., 2012).

A principal classe dos Polifenóides é representada pelos flavonoides, especialmente as antocianinas e antocianidinas que apresentam efeitos positivos à saúde humana, agem no combate aos radicais livres gerados pelo metabolismo celular e produzem antioxidantes que protegem o coração, auxiliando na cicatrização, evitando a oxidação das células, ajudando assim na absorção de ferro e na resistência aos processos infecciosos (SANHUEZA et al., 2005; FREEMAN, 2011).

Tabela 1 – Composição nutricional média do morango (g/100g)

| Nutriente/Componente | Teor em 100 g/Matéria Fresca |
|----------------------|------------------------------|
| Energia (Kcal)       | 32                           |
| Carboidratos (g)     | 7,4                          |
| Vitamina C (mg)      | 64                           |
| Minerais (g)         | 0,4                          |
| Fibras (g)           | 1,7                          |
| Antocianinas (mg)    | 15 a 60                      |
| Água (g)             | 92                           |

Fonte: Adaptado de Sanhueza et al., 2005.

A principal forma de consumo do morango é *in natura*, mas uma considerável quantidade é utilizada na indústria no prepara de certos produtos (SEERAM et al, 2006; CALVETE et al, 2008). Deve-se garantir manejo adequado durante todas as fases de produção, desde o cultivo, colheita, transporte e o armazenamento, com intuito de reduzir perdas e alcançar melhor aceitação pelo consumidor (ZAMBOLIM e COSTA, 2005; HENZ et al., 2008).

A maior parte da produção de morango é obtida pelo cultivo convencional. Em torno de 97% da produção total da região do Distrito Federal é feita neste sistema (ANTUNES e PERES, 2013). O sistema convencional é baseado principalmente no uso de agroquímicos para o controle de pragas e doenças, que pode provocar a redução da qualidade do fruto e de possível presença de resíduos químicos que apresentam risco à saúde do consumidor (EMATER, 2011).

#### **2.1.4 Contaminação dos morangos**

As frutas do morangueiro são altamente perecíveis devido ao alto teor de água em sua composição química. É importante conhecer e utilizar de maneira correta as práticas adequadas de manuseio durante as fases de colheita, pós-colheita, armazenamento, transporte, distribuição, comercialização e consumo, para que o tempo de conservação seja maximizado e ocorra redução das perdas pós-colheita mantendo frutas e hortaliças conservadas para um tempo maior de consumo (FREITAS-SILVA et al., 2013; COELHO et al., 2015).

Em relação ao sistema de cultivo orgânico no Brasil, estima-se que apenas pouco mais de 1% da produção total de morango seja nesse sistema. Segundo a EMATER-DF, no Distrito Federal em 2013, o sistema de cultivo orgânico do morangueiro alcançou uma produção de 98,5 toneladas, representando 1,5% do total da produção de morango do DF (ANTUNES, 2013). O consumo *in natura* de morango orgânico está comprometido pela suscetibilidade dos frutos à contaminação microbiológica. As práticas de manejo inadequadas, manipulação dos frutos sem um devido controle, o uso de matéria orgânica sem os devidos processos de compostagem entre outros fatores, tem permitido a contaminação dos frutos de morango por patógenos que, ao serem consumidos, causam infecções e danos à saúde humana (BOLLEN, 1985; OSHITA, 2012).

Deve-se levar em consideração 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). Por isso há uma grande importância nas etapas da cadeia produtiva, em que se deve priorizar a conservação das propriedades físico-químicas dos frutos armazenados, tais como pH, acidez total titulável, coloração e sólidos solúveis, além de controlado e/ou inibido o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, que

comprometem a sanidade do produto. A vida de prateleira do morango é limitada, entre cinco e sete dias, devido especialmente à alta atividade microbiana e respiratória (AGUAYO et al., 2006; NASCIMENTO e SILVA, 2010).

Diante desses fatos, é necessária a adoção de métodos que sejam eficientes na redução de microrganismos, tanto patogênicos como deteriorantes, de tal forma a garantir a segurança do produto e, conseqüentemente, reduzir a velocidade do processo de deterioração. É possível uma redução de até 90% da carga microbiana, adotando lavagem com água corrente, porém não é suficiente para tornar o alimento seguro. Em função disso, é fundamental a etapa de sanificação com a utilização de agentes que sejam eficientes na inativação dos microrganismos (BEUCHAT et al., 1998). Dentre as propriedades desejadas para um sanificante, destacam-se: possuir largo espectro antimicrobiano; ser de fácil uso; não possuir propriedades tóxicas e irritantes; ser economicamente viável (LELIEVELD et al., 2003).

Atualmente o cloro e derivados são muito utilizados na higienização das frutas e hortaliças, sendo aceito pela legislação brasileira. Os compostos clorados possuem algumas desvantagens no tratamento de água e na indústria de alimentos, pois este processo pode conduzir à formação de compostos organoclorados, trihalometanos e ácidos haloacéticos, que são mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos em água, em alimentos e/ou superfícies de contato (LAZAROVA et al., 1999; PRESTES, 2007; SILVA et al., 2011). Em alguns países da Europa, como Alemanha, Holanda, Dinamarca, Suíça e Bélgica, o uso de cloro em alimentos frescos foi proibido (NASCIMENTO e SILVA, 2010). Em vista disso, é essencial o estudo de alternativas ao cloro, que sejam eficientes na inativação de microrganismos e não representem risco aos consumidores. Uma alternativa que vem sendo estudada como agente antimicrobiano em produtos de origem vegetal e animal é o gás ozônio.

## **2.2 Ozônio**

### **2.2.1 Histórico**

De acordo com o livro "Ozone" de 1920 do físico-químico E. K. Rideal, que faz o primeiro panorama histórico das pesquisas com ozônio, os primeiros relatos do ozônio surgiram na Holanda. Em 1783 um cientista holandês chamado Martin Van Marum evidenciou que o ar submetido a uma série de faíscas elétricas em sua máquina



eletrostática adquiria um forte odor característico. De maneira similar, Cruickshank em 1801 demonstrou que o gás produzido pela decomposição eletrolítica de ácidos diluídos em certas condições, possuía certo odor semelhante ao demonstrado por Martin Van Marum. Esses dois pesquisadores não elucidaram e não foram a fundo sobre a origem de tal substância, apenas evidenciaram os resultados de suas experiências. Em 1840 o físico alemão Schönbein elucidou que o cheiro característico do oxigênio em descargas elétricas e eletrólise na verdade era um novo gás, que foi nomeado por ele de "ozone", palavra derivado do grego "ὄζειν", ozein – que significa "cheiro" (RIDEAL, 1920).

Bequerel e Freny foram os primeiros a demonstrar que o oxigênio poderia ser convertido em ozônio. Utilizaram um experimento simples: um tubo de descargas elétricas contendo oxigênio ( $O_2$ ) para geração de ozônio ( $O_3$ ); com a adição de solução de Iodeto de Potássio (KI) o ozônio era consumido na medida em que era formado (RIDEAL, 1920; OLIVEIRA e WOSCH, 2012).

Pesquisas sobre as propriedades oxidantes do ozônio foram conduzidas por Hunt em 1848, o que lhe permitiu postular que a estrutura molecular do ozônio é formada por um triângulo triatômico de oxigênio, uma forma alotrópica de  $O_2$ . O primeiro gerador de ozônio propriamente dito, foi desenvolvido por Werner von Siemens na Alemanha em 1857, baseado no efeito corona – descarga elétrica produzida pela ionização de um fluído nas redondezas de um condutor. Em 1888 a primeira patente foi emitida por Fewson nos Estados Unidos, que tinha por finalidade remover odores provenientes de esgotos (RIDEAL, 1920; GRAHAM, 1997; NOVAK e YUAN, 2007).

Um dos primeiros usos do ozônio como sanitizante foi com o tratamento de água, onde o primeiro experimento com essa finalidade foi instalado em 1893 na Holanda e posteriormente em 1906 começaram os estudos na Universidade de Sorbonne em Paris, França. Estudos com este novo composto começaram com o químico Marius Paul Otto, que evidenciou em sua tese, "*Recherches sur l'ozone*" – Pesquisas em Ozônio, a ação antimicrobiana do ozônio e deu início a sua utilização em estações de tratamento de água e esgoto em 1907, criando a "*Compagnie des Eaux et de l'Ozone*" (CEO) – Companhia de Água e de Ozônio. O ozônio já era utilizado em mais de 100 estações de tratamento na França em 1936 e em 40 diferentes lugares do mundo. Em escala comercial, no tratamento de água, o ozônio foi instalado em 1940 nos Estados Unidos (RIDEAL, 1920; GRAHAM, 1997; NOVAK e YUAN, 2007).

A ozonização como sanitizante já é uma tecnologia que vem sendo desenvolvida desde meados do século XX. Como exemplo temos a desinfecção de água na França há

mais de 100 anos. Em pouco mais de um século diversas áreas do conhecimento adotaram pesquisas com ozônio. Na conservação de alimentos o ozônio foi utilizado pela primeira vez em 1909, em câmaras frias de estocagem de carne, que àquela época não atingiu grandes proporções como uma agente conservante devido seu custo inicial comparado com outros produtos mais baratos como, por exemplo, o cloro (CHIATTONE et al., 2008). Em 1972 utilizam o ozônio para o tratamento de águas residuais na Alemanha. Já em 1977 na Rússia o uso do ozônio como agente microbicida em alimentos tornou-se evidente, utilizaram-se do gás para reduzir *Salmonella* em ovos com casca. No Brasil, os primeiros experimentos com ozônio começaram em 1983, segundo Dalsasso (1999), quando surgiu a necessidade de algumas estações de tratamento de água buscar formas alternativas para o tratamento, substituindo métodos convencionais como pré-cloração e pré-aeração de águas superficiais (SANTOS, 2008).

O ozônio foi declarado como uma substância segura (GRAS – "Generally Reconined as Safe"), pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1982, sendo seu uso permitido apenas como sanificante para água engarrafada. Alguns anos mais tarde a utilização do ozônio como aditivo direto em alimentos foi permitido pelo FDA; possibilitando assim o uso do ozônio como agente antimicrobiano no tratamento, armazenamento e etapas de processamento de alimentos (GRAHAM, 1997; KIM et al., 1999a; SOPHER et al., 2002; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; FDA, 2013).

Atualmente essa tecnologia tem sido destinada para diversos fins, tais como: tratamento de águas de piscinas, sanitização de recipientes de água, alimentos, plantas, equipamentos, conservação de frutas e hortaliças, etc. Outras áreas do conhecimento como a medicina, têm começado a adotar o uso do ozônio na chamada ozonioterapia, em diversas pesquisas referentes à saúde humana (MENDEZ et al., 2003; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; SOUSA et al., 2008; JUNIOR e LAGES; 2012).

### **2.2.2 Propriedades físico-químicas do Ozônio**

O ozônio ( $O_3$ ), ou oxigênio triatômico, é uma molécula instável formada pela adição de um átomo de oxigênio à molécula diatômica de oxigênio ( $O_2$ ), que pode ser produzido naturalmente como resultado de relâmpagos ou radiação ultravioleta (KIM et al., 1999a). Sinteticamente, a nível industrial, o gás ozônio é gerado pelo método de descarga elétrica no gás oxigênio, conhecido como descarga por efeito corona, o mesmo

utilizado no primeiro equipamento criado por Siemens em 1857 (GLAZE, 1987; BALAKRISHNAN et al., 2002; RUBIN, M.B, 2003; OLIVEIRA e WOSCH, 2012).

O efeito corona, na geração de ozônio, consiste na passagem de gás contendo oxigênio puro ou outras misturas de ar, através de alta energia em descarga elétrica. Moléculas de oxigênio são dissociadas e produzindo radicais livres altamente reativos, que ao reagir com outras moléculas de oxigênio formam o ozônio ( $O_3$ ), como indicado na Figura 1 (TRAMBARULO et al., 1953; KIM et al., 1999a; NOVAK e YUAN, 2007).

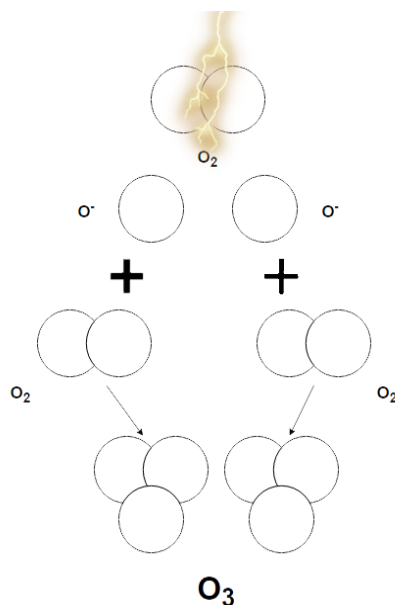


Figura 1 – Mecanismo de formação do Ozônio ( $O_3$ ) a partir de moléculas de Oxigênio ( $O_2$ ).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

O gás ozônio possui um elevado potencial oxidativo que o destaca como um ótimo sanitizante em alimentos. Esse potencial oxidativo é o terceiro mais poderoso encontrado na natureza, a nível comercial é o segundo, ficando atrás apenas do flúor. O potencial oxidativo do ozônio é de aproximadamente 2,07 mV, enquanto o do flúor consiste de aproximadamente 3,06 mV. Já o cloro utilizado na sanitização de alimentos possui um potencial de aproximadamente 1,36 mV (KIM et al., 1999a; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; MAHMOUND e FREIRE, 2007). Este elevado poder de oxidação do ozônio confere uma elevada capacidade na desinfecção e esterilização de alimentos, com um menor tempo de contato e menores concentrações, tornando o uso do ozônio como um sanitizante potencial na indústria.

Tabela 2 – Diferentes agentes oxidantes e os respectivos potenciais de oxidação

| Agente Oxidante        | Potencial de Oxidação (mV) |
|------------------------|----------------------------|
| Flúor                  | 3,06                       |
| Ozônio                 | 2,07                       |
| Peróxido de hidrogênio | 1,78                       |
| Permanganato           | 1,67                       |
| Dióxido de cloro       | 1,5                        |
| Hipoclorito            | 1,49                       |
| Cloro                  | 1,36                       |

Fonte: Manley et al., 1967 apud Güzel-Seydim et al., 2004

### 2.2.3 Características do Ozônio em meio aquoso

O ozônio é um gás instável, possui um tempo de meia vida curto (aproximadamente 20 min em água a 20°C), é parcialmente solúvel em água e, assim como a maioria dos gases, aumenta sua solubilidade à medida que a temperatura decresce (KIM et al., 1999a; WYSOK et al., 2006). Essa solubilidade do ozônio em meio aquoso dependerá do conteúdo de matéria orgânica no meio, pois quanto menor a concentração de matéria orgânica, maior será o tempo de meia vida do ozônio em água (GRAHAM, 1997; KIM et al., 1999b).

Tabela 3 – Solubilidade do gás ozônio em meio aquoso de acordo com a temperatura

| Temperatura (°C) | Solubilidade L O <sub>3</sub> / L H <sub>2</sub> O |
|------------------|--|
| 0                | 0,640  |
| 15               | 0,456  |
| 27               | 0,270  |
| 40               | 0,112  |
| 60               | 0  |

Fonte: Rideal, 1920; Güzel-Seydim et al., 2004; Wysok et al., 2006.

A decomposição do ozônio em meio aquoso é caracterizada por uma rápida diminuição da concentração inicial, com uma fase posterior na qual a concentração de ozônio diminui segundo uma cinética de primeira ordem, sendo que os radicais hidroxila (OH) são os principais produtos desta decomposição (KIM et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004). O ozônio pode reagir com compostos orgânicos em solução aquosa através da reação direta: o próprio ozônio molecular atua; e, da reação indireta:

envolve reações com os radicais hidroxila (OH), formados da decomposição do ozônio em meio aquoso, descritos acima. Essa reação indireta não é seletiva, pois ela é capaz de promover um ataque a compostos orgânicos  $10^6$ - $10^9$  vezes mais rápido que alguns agentes oxidantes como, por exemplo, o  $H_2O_2$  e o próprio ozônio. Predominantemente processos de desinfecção ocorrem via ozônio molecular, já processos de oxidação podem ocorrer tanto por meio do ozônio molecular, via direta, como dos radicais hidroxila, via indireta (ALMEIDA et al., 2004; DI BERNADO e DANTAS, 2005; SILVA et al., 2011).

Outro fator importante que leva à rápida decomposição do ozônio em meio aquoso e à formação de radicais hidroxila (OH), assim como outros compostos oxidantes com distintas reatividades, são ambientes que apresentam altos níveis de pH. As alterações na eficiência do processo de desinfecção, quando há uma representativa variação no pH do meio, relacionam-se com mudanças na taxa de decomposição do ozônio (KIM et al., 2003; DI BERNADO e DANTAS, 2005). Segundo Kim et al., (1998), a estabilidade do ozônio em água decresce quando o pH do meio aumenta; quando esse pH é superior a 8,0 praticamente metade do ozônio introduzido é decomposto em várias formas intermediárias de oxigênio, num período de 10 min (KIM et al., 2003; WYSOK et al., 2006).

A potencialidade do ozônio na indústria alimentícia é grande e chama a atenção. O ozônio é um dos mais potentes sanitizantes na esterilização de bactérias em alimentos. As vantagens da utilização do ozônio na indústria alimentícia são grandes, pois descarta a necessidade de manipulação, armazenamento (é produzido *in loco*) ou de recipientes de produtos químicos, não gerando resíduos, pois sua autodecomposição é rápida convertendo-se em oxigênio, não deixando resíduos nos alimentos tratados (KIM et al., 1999a; NAITO e TAKAHARA, 2006; GIORDANO, 2009).

#### **2.2.4 Segurança do Trabalho na aplicação do Ozônio**

Na aplicação do ozônio deve-se ter cuidado especial quanto ao local em que o gás será injetado, pois o ozônio em altas concentrações é um gás tóxico ao homem e aos animais, sendo o primeiro alvo o trato respiratório (HOOF, 1982; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004). O uso de um sistema seguro é de importância primária na aplicação do ozônio na indústria de alimentos. São essenciais sistemas de detecção e destruição do

gás ozônio para a segurança dos trabalhadores. É necessário a instalação no local de ozonização um detector com célula ajustada para medição da concentração do gás na faixa entre 0,01 e 100 ppm; além disso, outro equipamento essencial é o destruidor térmico ou catalítico de ozônio que deve ser instalado com a finalidade de acelerar a decomposição do ozônio residual na saída do sistema (DAMEZ et al., 1991; KHADRE et al., 2001a).

Vale ressaltar que essa toxicidade do ozônio desaparece quando este se decompõe em oxigênio. No Brasil, a exposição ao gás ozônio segue a determinação do Ministério do Trabalho e Emprego por meio da Norma Regulamentadora N° 15 (NR 15), aprovada pela Portaria N° 3.214/78, que disponibiliza os limites de tolerância do ozônio (descrito como Ozona na norma), em atividades/operações que o trabalhador poderá ficar exposto; diversos institutos (Tabela 4) realizaram estudos referentes aos níveis de exposição ao gás ozônio. O limite do gás para trabalhos de até 48 horas semanais é de 0,08 ppm ou 0,16 mg/m<sup>3</sup> (BRASIL, 1978).

Tabela 4 – Referência dos Níveis de Exposição para Ozônio

| Instituição  | Concentração máxima permitida (ppm) no ar | Tempo de exposição para o ser humano em ar ozonizado |
|--|---|--|
| Food and Drug Administration (FDA)                           | 0,05                                      | 8 hs   |
| Occupational Safety and Health Administration (OSHA)         | 0,10                                      | 8 hs   |
| National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) | 0,10                                      | Permanente   |
| Environmental Protection Agency (EPA)                        | 0,08                                      | 8 hs   |
| Ministério do Trabalho e Emprego (Brasil) – Portaria 3214/78 | 0,08                                      | 48/semana  |

Fonte: Gonçalves, 2009.

### **2.2.5 Ozonização como alternativa à Cloração na Sanitização do morango**

Segundo White (1999), a desinfecção é o processo em que se usa um agente químico ou físico, com o objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos presentes na água, o que vale para os produtos de origem vegetal, evitando a síntese de proteínas, de ácidos nucleicos e coenzimas. De acordo com o mesmo autor, os desinfetantes devem destruir os organismos patogênicos, não devem ser tóxicos aos seres humanos e animais domésticos, além de não causar alterações no produto, serem de baixo custo, oferecerem condições seguras de transporte, aplicação, armazenamento e manuseio (BORGES e GUIMARÃES, 2002).

Diversos tipos de sanitizantes estão disponíveis hoje no mercado, porém a eficiência e segurança de cada um destes produtos dependem de variáveis como: microrganismos alvo, características intrínsecas de cada alimento que será sanitizado, tempo de exposição, pH, temperatura e concentração utilizada desse sanitizante (KIM et al., 1999a; FREITAS-SILVA et al., 2013; COELHO et al., 2015).

Um dos sanitizantes mais utilizados hoje na indústria é o cloro, sendo este um produto de fácil aplicação, possui baixo custo e um amplo espectro de ação microbiana. Além disso, o cloro foi um importante sanitizante na descontaminação de água do século XX e, antes de sua descoberta, milhares de pessoas morriam todos os anos por utilizarem água contaminada. Porém, desde meados de 1975, os compostos colorados vêm sofrendo restrições em sua utilização. Nos Estados Unidos, por exemplo, o interesse pelo processo de ozonização no tratamento de águas deu início após a identificação dos compostos halogenados que são gerados a partir do processo de sanitização utilizando a cloração (RICE et al., 1981; RICHARDSON, 2003; SILVA et al., 2011).

O ozônio pode ser vantajoso em função da remoção de um número maior de microrganismos, como vírus e cistos de protozoários. Ao contrário do cloro, o ozônio não forma compostos orgânicos halogenados quando usado como desinfetante de água contendo matéria orgânica natural. Estudos recentes mostram que o uso de certos desinfetantes em altas concentrações está contribuindo para o surgimento de microrganismos resistentes a desinfecção (LAZAROVA, 1999; DANIEL, 2001; SILVEIRA, 2004; SILVA, 2011).

Uma comparação entre os processos de cloração e de ozonização referentes à segurança, sanitização, residual tóxico, formação de subprodutos e investimentos, encontra-se na Tabela 5, proposta por Lazarova (1999).

Tabela 5 – Comparação das características dos processos de cloração e ozonização. -, nenhum; +, baixo; ++, médio; +++, alto

| Características         | Cloração | Ozonização |
|-------------------------|----------|------------|
| Segurança               | +        | ++         |
| Remoção de Bactérias    | ++       | ++         |
| Remoção de Vírus        | +        | ++         |
| Remoção de Protozoários | -        | ++         |
| Residual Tóxico         | +++      | +          |
| Subprodutos             | +++      | +          |
| Custos Operacionais     | +        | ++         |
| Custos de Investimento  | ++       | +++        |

Fonte: Lazarova et al., (1999) apud Silva et al., (2011).

Em relação aos subprodutos, é demonstrado que no processo de ozonização há baixa formação destes compostos em relação à cloração, mas essa formação de subprodutos diz respeito à água que apresenta íon brometo, que leva à formação de subprodutos bromados na utilização com ozônio (RICHARDSON et al., 2000; DI BERNADO e DANTAS, 2005; SILVA et al., 2011). Quando não há a presença de tais compostos pode-se dizer que os subprodutos da ozonização é nulo, pois sua autodecomposição é o próprio oxigênio, que torna a ozonização uma tecnologia limpa.

### 2.2.6 Análise Econômica

Em relação ao custo de implantação de um sistema gerador de ozônio devem-se fazer estudos do custo de aquisição do equipamento juntamente com as diferentes estruturas de custos, divididos em custos fixos e custos variáveis. Custos fixos, aqueles que não dependem do nível de produção da unidade, como o custo de oportunidade do capital e a depreciação do gerador de ozônio. Os custos variáveis, aqueles que dependem diretamente do nível de produção da unidade, ou seja, o custo da energia elétrica e da degradação do produto armazenado (BUARQUE, 1991; PEREIRA, 2006).



### 2.3 Qualidade Microbiológica de morangos

As práticas inadequadas de manejo do morangueiro podem ser responsáveis por diversos tipos de contaminações, tais práticas como: manipulação dos frutos sem um devido controle, o uso de matéria orgânica sem os devidos processos de compostagem, entre outros, tem permitido que os patógenos penetrem na epiderme dos frutos do morango podendo causar danos à saúde do consumidor (BOLLEN, 1985; OSHITA, 2012). Outra forma de contaminação é o uso de água de irrigação não tratada, que tende a favorecer o desenvolvimento de potentes microrganismos contaminantes. O contexto pode se tornar pior se a manipulação na colheita e antes da comercialização não for precedida de algum processo de lavagem, sanitização e refrigeração. Para garantir morangos de boa qualidade é fundamental que as pessoas envolvidas nesta atividade adotem boas práticas agrícolas e de produção, evitando o número de enfermidades transmitidas pelos alimentos (MATTOS, 2004; VANETTI, 2007; ALCÂNTARA, 2009).

Esses cuidados e as boas práticas são de extrema importância e devem acompanhar toda a cadeia produtiva, desde a colheita, o armazenamento, transporte, recepção e processamento, pois a perda de qualidade ocorre de modo cumulativo (KOKKINAKIS e FRAGKIADAKIS, 2007).

Vale ressaltar que, no caso dos alimentos minimamente processados, após a etapa de higienização não há aplicação de nenhum outro tratamento posterior que assegure a inativação e/ou eliminação ou redução no número de microrganismos presente na matéria-prima ou incorporados durante o processamento (MORETTI, 2007).

A higienização corresponde a duas etapas básicas: primeiramente a limpeza, que consiste na operação de remoção de terra, resíduos de alimentos e/ou equipamentos e ambiente e substâncias indesejáveis; e, como segunda etapa, desinfecção ou sanitização, correspondente a operação de redução, por método físico ou agente químico, do número de microrganismos a um nível que não comprometa a segurança do alimento (BRASIL, 2002).

Há três formas de classificarmos os microrganismos presentes nos alimentos: 1) *microrganismos deteriorantes* – são aqueles capazes de produzir alterações químicas prejudiciais causando deterioração microbiana e modificação das características organolépticas; 2) *microrganismos patogênicos* – é um risco à saúde humana e animal e

podem afetar homens e animais; geralmente a presença deste patógeno é um indicador de condições insatisfatórias de sanidade nas diferentes etapas agrícolas; 3) *microrganismos benéficos* – são aqueles que junto aos alimentos produzem alterações benéficas, transformando as características e obtendo como resultado um novo alimento; podemos encontrar exemplos destes microrganismos na fabricação de vinho, cerveja, queijo, pães, etc. (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A sanitização tem uma importante contribuição para o aumento da vida de prateleira do produto, pois possibilita a redução e/ou eliminação da contagem microbiana presente e potencialmente nociva, seja deterioradora ou patogênica (FERNANDES, 2013).

No caso de frutas minimamente processadas, a etapa de sanitização tem como finalidade minimização da deterioração e da proliferação de patógenos, além da contribuição para manutenção da qualidade do produto. Sendo assim, é extremamente importante o processo de sanitização, pois as etapas seguintes no processamento são ineficientes para redução ou eliminação dos microrganismos presentes (OIE et al., 2008; ÖLMEZ e KRETZSCHMAR, 2009; FERNANDES, 2013).

### **2.3.1 Microrganismos de Interesse**

Um dos indicadores na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos é a contagem de microrganismos do grupo dos coliformes que, além do fator de indicador, contém cepas patogênicas que produzem doenças no ser humano e nos animais (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Os coliformes pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bactérias em formas de bastonetes, Gram negativas e, não produzem esporos. Os gêneros que compõem esse grupo são: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, dos quais somente *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal, sendo que os outros gêneros estão presentes no ar, poeira, solo e nos alimentos. Elevadas contagens destes microrganismos em alimentos nos diferentes processos de produção podem indicar falhas na higiene e riscos sanitários (SIQUEIRA et al., 1997).

Os coliformes termotolerantes diferenciam-se dos coliformes totais pela capacidade de multiplicar-se e fermentar a lactose a 44,5 °C, em 24 horas e produzir gás. Incluem algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo as mais importantes as

do gênero *Escherichia*, que indica contaminação fecal (SIQUEIRA, 1997; SILVA et al., 2007).

*Escherichia coli* é considerada a espécie dominante estando entre os microrganismos anaeróbios facultativos que comumente fermentam lactose com produção de ácido e gás. Fazem parte da microbiota intestinal dos humanos e animais de sangue quente estirpes não patogênicas. Entretanto, algumas estirpes são patogênicas e apresentam fatores de virulência, provocando no homem infecções gastrointestinais, tais como diarreia, cólicas intestinais e hemorrágicas (OFFIT e MOSER, 2009; YANG e WANG, 2014).

Outro gênero de interesse nesta pesquisa é *Salmonella* que são bactérias bacilares Gram negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e intracelulares. É um dos agentes mais relevantes de doenças transmitidas por alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Existem relatos com relação a surtos de *Salmonella* spp. em diversos alimentos. Muitas espécies são resistentes em condições adversas permanecendo inativas por muito tempo até que as condições sejam favoráveis novamente. Segundo o relatório da “European Food Safety Authority” (EFSA) de 2010, a *Salmonella* spp. foi identificada como a causa mais frequente dos surtos de origem alimentar e a segunda doença zoonótica mais frequente nos EUA, sendo a *S. enteritidis* e *S. typhimurium* os sorotipos mais associados às doenças humanas (FERNÁNDEZ et al., 2013). Um grande quantitativo de frutas e vegetais frescos tem sido associado a infecções por *Salmonella* spp. nos últimos anos, como a alface, brotos de sementes, melão, tomate, pimenta e manjeriço (HEATON e JONES, 2008; BERGER et al., 2010).

Embora o consumo de morango apresente uma demanda ascendente, também aumentam as preocupações sobre a segurança microbiológica. Conforme relatado numa pesquisa realizada nos EUA pela “Food and Drug Administration” (FDA), em 1999, descobriu-se que um em cada 143 amostras testadas de morangos importados apontou a presença de *Salmonella* spp. (HUANG et al., 2013).

Em relação aos fitopatógenos fúngicos que causam podridão nos frutos do morangueiro em pós-colheita no Brasil, os que possuem maior destaque são: *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e espécies de *Colletotricum*; há algumas espécies que são relatadas com menor frequência, dentre elas: *Phytophthora* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pestalotia longisetula*, *Gnomonia Comari* e *Alternaria* spp. (COSTA et

al., 2003; DIAS et al., 2005; ZAMBOLIM e COSTA, 2006; HENZ et al., 2008; LOPES, 2011).

*Colletotrichum* é um gênero que possui diferentes espécies que provocam doenças no morango, entre elas as três principais, que podem causar podridão nas frutas e na coroa do morango são: *C. gloeosporoides*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* (MAAS, 1984). É o agente causal de uma das mais importantes doenças do morango, a Antracnose, que provoca danos no caule, folhas, estolões, flores e frutos. Comumente, espécies de *Colletotrichum* são classificadas com base na morfologia conidial, presença de acéculos, produção de apressório e planta hospedeira de origem. É muito comum que a doença inicie o desenvolvimento na fase de cultivo, mas os sintomas não aparecem antes do amadurecimento das frutas. Em morangos, a espécie *C. acutatum* gera extensas perdas na produção dos frutos; além disso, é considerado o segundo patógeno mais relevante seguido por *Botrytis cinerea* em termos de impactos econômicos, que vem se espalhando em todo o mundo, através de material vegetativo (ALVAREZ e NISHIJIMA, 1987; SREENIVASAPRASAD e TALHINHAS, 2005; LIU et al., 2007; CALLEJA et al., 2013).

Agente causal da doença conhecida como mofo cinzento. Este gênero abrange principalmente flores e frutos, porém pode provocar tombamento em plântulas, manchas foliares e apodrecimento de brotos, bulbos, rizomas, tubérculos e raízes (TÖFOLI et al., 2011). *B. cinerea* Pers. é a espécie registrada no cultivo de morango. A contaminação pode ocorrer na flor e permanecer em repouso até a maturação dos frutos, a partir de então se inicia a multiplicação acelerada deste fungo, causando deterioração das frutas (KOVACH et al., 2000). Este bolor se desenvolve e dissemina-se até em condições de refrigeração, já que a germinação de conídios e o crescimento micelial pode ocorrer a temperaturas menores que 0 ° C (DORBY e LICHTER, 2007; LAHLALI et al., 2007). No Brasil, é considerada a doença mais importante em pós-colheita de morango (REIS e COSTA, 2011). Podem provocar perdas significativas durante o transporte e comercialização (CEPONIS et al., 1987).

Segundo Lopes (2011), *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. e *Mucor* spp. são descritos como causadores de podridões em frutos de morango (MAAS et al., 1998; FRAIRE-CORDEIRO et al., 2003). Entretanto estes fungos não são relatados em frutos de morango no país, mesmo sendo citados como patógenos em diversas culturas. O primeiro relato desses microrganismos causando podridão em frutos de morango no Brasil é descrito por Lopes (2011).

*Rhizopus stolonifer* é considerada a espécie mais importantes deste gênero, e uma das principais doenças na pós-colheita de morango. Embora a doença não seja observada no campo, as estruturas do fungo podem ser espalhadas pelo vento e insetos das folhas infectadas passam para o fruto, causando a infecção, que geralmente ocorre durante a colheita e manuseio dos frutos. Os sintomas iniciais são a alteração da cor, o amolecimento do fruto e o escorrimento dos fluídos. Devido à grande variedade de hospedeiros que *R. stolonifer* pode infectar e sua rápida penetração e colonização, tornou-se um importante alvo de controle na fase de campo (KLIMATI et al., 1997; CSC e CMCC, 2003; FRANCO e LANDGRAF, 2008; ZHANG et al., 2010).

Os frutos podem ser infectados em todos os estágios de desenvolvimento, provocando uma descoloração acastanhada. Numa fase posterior, quando o fruto está maduro, as áreas afetadas sofrem uma depressão. Além disso, em condições de elevada umidade apresentam crescimento de mofo branco fino na superfície do fruto (MADDEN et al., 1991; KLIMATI et al., 1997). Odor e sabor desagradáveis são sintomas evidentes do apodrecimento gerado por *Phytophthora*. Os frutos maduros infectados têm um gosto amargo e desagradável, que pode ser sentido até mesmo em compotas e geleias (JELÉN et al., 2005; REIS e COSTA, 2011).

São fungos predominantemente unicelulares não homogêneos. Reproduzem-se vegetativamente por meio de brotamento das células e menos frequentemente por fissão celular. Essa característica confere às leveduras a capacidade de se reproduzirem rapidamente sob condições anaeróbias em ambientes líquidos, o que ajuda na dispersão das células. As leveduras se multiplicam mais lentamente do que as bactérias, não competindo bem em ambientes que permitam o desenvolvimento bacteriano, já que precisam de menos umidade do que as bactérias, e de pH ácido. Existem diversos tipos de leveduras que sobrevivem nos alimentos, entretanto os gêneros mais comuns nas frutas são: *Sacharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rodotorula*, *Kloeckera* e *Cryptococcus* (WILEY, 1997; TANIWAKI e SILVA, 2001; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

No manejo das doenças do morangueiro a estratégia mais utilizada é a aplicação de fungicidas. Sendo que este manejo das doenças tem como consequência um aumento dos custos de produção, risco de intoxicação dos trabalhadores, contaminação do meio ambiente e o risco da resistência genética de alguns desses microrganismos. Consumidores e produtores estão buscando produtos que diminuam impactos ambientais, livres de resíduos químicos e que podem ser empregados por pequenos,

médios e grandes produtores (ZAMBOLIM, 1990; MAAS, 1998; COSTA et al., 2003; DIAS et al., 2005).

O gás ozônio apresenta-se neste cenário como uma alternativa no controle de microrganismos da cultura do morangueiro, inativando microrganismos e mantendo as qualidades fisiológicas dos frutos no armazenamento. É importante salientar o potencial desta tecnologia para a produção de morangos orgânicos, pois o sistema de produção dos orgânicos não permite a utilização de produtos químicos no controle de pragas e doenças. O ozônio pode se tornar uma solução, já que é uma tecnologia limpa e que não gera resíduo. Porém, devido a alta capacidade oxidativa do ozônio, é necessário avaliar a qualidade físico-química dos frutos durante o armazenamento. Além de atuar no controle de microrganismos, o gás ozônio não pode alterar as qualidades organolépticas dos frutos, pois, é essencial que o produto final destinado à indústria e, principalmente, o fruto *in natura* destinado ao consumidor seja seguro no aspecto da segurança alimentar, e que tenha boa qualidade.

## **2.4 Parâmetros utilizados na avaliação da qualidade físico-química**

A qualidade dos frutos e vegetais é uma combinação de atributos que determinam o seu valor como alimento, tais como: a aparência visual – frescor, cor, defeitos, doenças, etc.; textura – firmeza, suculência, integridade dos tecidos; gosto – sabor, cheiro; valor nutritivo – teor em vitaminas, minerais e fibras; segurança – ausência de resíduos químicos e contaminação microbiana (SZCZESNIAK, 2002).

A qualidade no morango é definida como um conjunto de atributos físicos e químicos, em que a aparência do produto, firmeza, sabor e valor nutricional são importantes e atrativos para o consumidor. Estes atributos físicos e químicos na qualidade do morango estão relacionados com sólidos solúveis totais, pH, acidez, compostos bioativos, compostos fenólicos e ácido ascórbico, que vão influenciar no sabor e cor do fruto (COSTA, 2009).

### **2.4.1 Sólidos Solúveis Totais**

Os sólidos solúveis Totais (SST) são compostos solúveis em água encarregados de fornecer a quantidade de substâncias sólidas que se encontram presentes na polpa das

frutas. São responsáveis pelo sabor, sendo constituído por açúcares, principalmente sacarose, frutose e glicose. Geralmente é feito com o objetivo de se ter um valor estimado da quantidade desses açúcares presentes nos frutos, através de refratômetro, que também podem estar presentes, em menor volume, pectinas, fenólicos, vitaminas, sais, ácidos e aminoácidos e ácidos orgânicos (CHITARRA, 1999; LUCENA, 2006).

Entre os diversos componentes da fruta, os sólidos solúveis totais (representados pelo °Brix) desempenham um papel primordial para a sua qualidade, podendo atuar como um indicador de colheita – se foi adequada ou não. A quantidade de sólidos solúveis totais no morango varia segundo o estágio de maturação, tendendo a elevar-se conforme aumentam os dias de armazenamento (SHAW, 1990; MONTERO et al., 1996).

Os teores de sólidos solúveis variam bastante entre as diversas cultivares de morango, além da influência de fatores climáticos (SILVA, 2011). Cunha Junior et al. (2012) encontraram valores médios na cultivar Oso Grande em torno de 7,2 °Brix. Segundo os autores Shamaila et al. (1992), encontraram, dentre cinco diferentes cultivares de morango, valores entre 7,7 e 9,7 °Brix. Entretanto, Montero et al. (1996), encontraram valores que variaram de 4,5 a 15 °Brix, trabalhando com a cultivar Chandler.

#### **2.4.2 Acidez Total Titulável**

Os dois métodos geralmente mais utilizados para medir a acidez de frutos são a acidez total titulável (ATT) e o potencial hidrogeniônico (pH), sendo que a acidez total titulável, mensurado por titulometria, representa todos os grupamentos ácidos encontrados – ácidos orgânicos livres, na forma de sais e compostos fenólicos. O conteúdo desses ácidos orgânicos diminui com o amadurecimento na maioria dos frutos devido à utilização destes no ciclo de Krebs, na conseqüente transformação em açúcares durante o processo respiratório (CHITARRA, 1999; LUCENA, 2006).

#### **2.4.3 pH**

O potencial hidrogeniônico (pH) é importante para a avaliação de deterioração presente no alimento, tais como: o crescimento de microrganismos, atividade das enzimas, retenção de sabor e odor dos produtos (KRAMER, 1973; LUCENA, 2006).

#### **2.4.4 Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT)**

**Ratio** – relação entre os valores de sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT) é uma relação que avalia representativamente o sabor de frutos, demonstra o equilíbrio entre os teores de açúcares e acidez presente, apresentando-se como uma avaliação mais refinada do sabor de frutos do que a medição isolada dessas características. O sabor doce do fruto está relacionado com a relação SST/ATT, porque quanto maior a relação entre esses dois fatores, maior será o grau de doçura do fruto (CHITARRA e CHITARRA, 2005; SILVA, 2011).

Segundo os autores, Chitarra e Chitarra (2005), os açúcares solúveis presente nas frutas, de forma livre ou combinada, são responsáveis por características como: doçura; flavor – balanço entre os ácidos; cor atrativa; e, textura – polissacarídeos estruturais. Um dos principais componentes solúveis dos morangos e que atuam como fontes de energia para transformações metabólicas são os açúcares; estes açúcares, com o avanço da maturação têm seus teores elevados, e isso se dá principalmente à hidrólise de carboidratos de reserva acumulados durante o crescimento do fruto ainda na planta, o que resultará na produção de açúcares solúveis totais (WILLS et al., 1998; SILVA, 2011).

#### **2.5 Ozônio como Sanitizante em morango**

A maioria dos microrganismos fitopatogênicos e contaminantes alimentares são suscetíveis aos efeitos do ozônio, onde ele atua na oxidação das membranas celulares (KIM et al., 1999a; KHADRE et al., 2001a). O gás ozônio é um forte agente antimicrobiano que pode atuar na inativação ou inibição do desenvolvimento de fungos potencialmente aflatoxigênicos, como dos gêneros: *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium* e *Mucor*, etc (RAILA et al., 2006; WU et al., 2006; ZOTTI et al., 2008; ALENCAR et al., 2013), além de possuir um amplo espectro de ação, atuando sobre vírus, bactérias, fungos já citados, leveduras e formas esporuladas (KIM et al., 1999b; KHADRE et al., 2001a; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; AGUAYO et al., 2006; ÖZTEKIN et al., 2006; WHANGCHAI et al., 2006; ALENCAR, 2009; OSKAN et al., 2011). Dentre as espécies de bactérias patogênicas que apresentaram sensibilidade ao



gás ozônio, tem-se *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Bacillus cereus* e *Samonella* spp (KHADRE et al., 2001a; STEENSTRUP e FLOROS, 2004; AKBAS et al., 2008; PATIL et al., 2010; TORLAK et al., 2013).

A inativação de microrganismos pelo ozônio é atribuída, principalmente, à ruptura do envoltório celular e posterior dispersão dos constituintes citoplasmáticos, ou seja, a inativação por completo da célula (KIM et al., 1999a; KHADRE et al., 2001a; CULLEN et al., 2009). De acordo com Victorin (1992), existem dois mecanismos do ozônio na destruição de biomoléculas: no primeiro mecanismo, o ozônio oxida grupos sulfidríla 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.

Há poucos relatos no Brasil da utilização de aplicação do gás ozônio como sanitizante na conservação de morangos, mesmo tendo diversos trabalhos na literatura sobre a ozonização como tecnologia atuante na preservação de alimentos. Em um trabalho realizado por Ponce et al. (2010), foi observado o efeito do gás ozônio como sanitizante, avaliando-se a qualidade físico-química e microbiológica de morangos tratados com ozônio. Essa avaliação usou somente uma combinação de concentração do gás e período de ozonização. Foi adotada uma concentração de 50 ppm e um período de exposição de 60 minutos. Diante disso, são necessários mais estudos onde se adotem diferentes combinações de concentração do gás e diferentes períodos de ozonização. Há também a importância de estudar a viabilidade do uso da água ozonizada na conservação dos frutos em diferentes condições de armazenamento.

A eficácia do ozônio como sanitizante é bem evidenciada e seu papel como um potente oxidante já é conhecido desde o início do século XX com as estações de tratamento de água na França; entretanto, devido à facilidade e o preço mais acessível, os produtos clorados tomaram conta do cenário mundial, pois no começo do século, o interesse pelos produtos clorados foi desencadeado pela Primeira Guerra Mundial (RIDEAL, 1920; CHIATTONE et al., 2008). Além disso, a produção do gás ozônio era uma tecnologia cara devido a alta demanda energética. Contudo nesta década, o ozônio adquiriu novamente importância no cenário mundial, quando a busca por sustentabilidade e tecnologias que agridem menos o meio ambiente e a saúde humana

têm se tornado prioridades. O uso sustentável da água é o maior exemplo e o ozônio, devido às suas características, torna-se uma ótima alternativa para um problema que cresce cada vez mais: o uso racional da água.

São muitas as utilizações concebíveis da água ozonizada no processo de pós-colheita do morango, assim como de outras frutas e hortaliças, incluindo tratamentos para controlar infecções de patógenos e os seus propágulos nos vegetais, saneamento de água em sistemas de lavagem, tanques de descarga ou canais, ou saneamento das superfícies de equipamentos e de embalagens. Segundo Sopher et al. (2002), as principais empresas embaladoras de maçãs no estado de Ohio nos EUA têm substituído o uso do cloro pela aplicação de ozônio, aumentando o controle de microrganismos e um reaproveitamento racional da água. Uma dessas empresas instalou um sistema de tratamento com ozônio na água que melhorou as operações, além de conseguirem economizar mais de 12 mil litros de água por semana, já que a água é reutilizada e não substituída diariamente.

Diante de tudo que foi exposto, é de extrema importância realizar estudos com água ozonizada como um sanitizante alternativo para o controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos em pós-colheita de morango, sugerindo condições para este processo e avaliando os parâmetros físico-químicos durante o armazenamento.

### 3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.

ALCÂNTARA, E. M. **Caracterização física, química e microbiológica de morango, alface e cenoura**. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, MG. 2009.

ALENCAR, E. R. **Processo de Ozonização de Amendoim (*Arachis hypogea* L.): cinética de decomposição, efeito fungicida e detoxificante de aflatoxinas e aspectos qualitativos**. 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; PINTO, M. S.; COSTA, A. R. Postharvest quality of ozonized nanicao cv. Bananas. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, p. 107-114, 2013.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A.; DURÁN, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**. Vol. 27, No. 5, 818-824, 2004.

ALVAREZ, A. M.; NISHIJIMA, W. T. Postharvest diseases of papaya. **Plant Disease**, v.71, n.8, p. 681–686, 1987.

ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, n.1-2, p.156-161, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos. Relatório de atividades de 2011 e 2012. Gerência-Geral de Toxicologia. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat10\\_13\\_1.pdf](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat10_13_1.pdf)>. Acesso em: 16 de Novembro, 2016.

BALAKRISHNANA, P. A., ARUNAGIRIA, A., RAO, P. G. Ozone Generation by Silent Electric Discharge and its Application in Tertiary Treatment of Tannery Effluent **Journal of Electrostatics**, v. 56, pp. 77–86. 2002.

BERGER, C. N.; SODHA, S. V.; SHAW, R. K.; GRIFFIN, P. M.; PINK, D.; HAND, P.; FRANKEL, G. Minireview: fresh fruit and vegetables as vehicles for the

transmission of human pathogens. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 2385-2397, 2010.

BEUCHAT, L. R.; NAIL, B. V.; ADLER, B. B.; CLAVERO, M. R. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1305-11, 1998.

BOLLEN, G. J. The fate of plant pathogens during composting of crop residues. In: GASSER, J.K.R. (Ed.). **Composting of agricultural and other wastes**. London: Elsevier Applied Science. 1985.

BORGES, J. T; GUIMARÃES, J. R. A Formação e os Riscos Associados à Presença de Trihalometanos em Águas de Abastecimento. **VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental - VI SEBESA**. 2002. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/sibesa6/seis.pdf>>. Acesso em: 04 de Novembro, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003**, Brasília, DF. 2003.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **Norma Regulamentadora N° 15 - Atividades e Operações Insalubres, Portaria GM n° 3.214, de 08 de junho de 1978**, publicada no Diário Oficial da União de 06.07.1978. Brasília, DF. 15° edição atualizada. Editora Saraiva. 2015.

BRASIL. **Resolução RDC n°275, de 21 de outubro de 2002**. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação aplicados aos estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos. Diário Oficial da União. Brasília. DF. 06 nov. 2002.

BUARQUE, C.; **Avaliação econômica de projetos**. In: BUARQUE, C. Avaliação Financeira e Econômica. Editora Campus, 1991 p. 130-180.

CALLEJA, J. E.; ILBERY, B.; SPENCE, N.J.; MILLS, P.R. The effectiveness of phytosanitary controls in preventing the entry of *Colletotrichum acutatum* in the UK strawberry sector. **Plant Pathology**, v.62, p. 266-278, 2013.

CALVETE, E. O.; MARIANI, F.; WESP, C. L.; NIENOW, A. A.; CASTILHOS, T.; CECCHETTI, D. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.396-401, 2008.

CARVALHO, S. F.; FERREIRA, L. V.; COCCO, C.; PICOLOTTO, L.; CANTILLANO, R. F. F.; ANTUNES, L. E. C. Caracterização física e química de cultivares de morangos de dias neutros. **XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura**. 2012.

- CASTRO, R. L. Melhoria Genética do Morangueiro: Avanços no Brasil. 2º Simpósio Nacional do Morango. 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas. **Embrapa Clima Temperado - Documento 124**. p. 22 a 36. 2004.
- CEPONIS, M. J.; CAPPELLINI, R. A.; LIGHTNER, G. W. Disorders in sweet cherry and strawberry shipments in the New York market, 1972–1984. **Phytopathology**. p. 472-475, 1987.
- 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, A. B. **Armazenamento de frutos e hortaliças por refrigeração**. Lavras. UFLA: FAEPE. 1999. 62 p.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA. 2ª Ed., 2005, 256p. 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. S.; FREITAS-SILVA, O.; CAMPOS, R. S.; BEZERRA, V. S.; CABRAL, L. M. C. Ozonização como tecnologia pós-colheita na conservação de frutas e hortaliças: Uma revisão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 2015.
- 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, Viçosa, MG. 2009.
- COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Doenças de hortaliças que se constituem em desafio para o controle. pp 319-344. In: Zambolim, L., Lopes, C. A.; Picanço, M. C; Costa, H (Eds.). **Manejo Integrado das doenças e pragas: Hortaliças. Viçosa: 2007**.
- CSC (California Strawberry Commission) and CMCC (The California Minor Crops Council) **A Pest Management Strategic Plan for Strawberry Production in California**. 2003.
- 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**, Amsterdam, v.20, p.125-136, 2009.
- CUNHA JUNIOR L. C; JACOMINO A. P; OGASSAVARA F. O; TREVISAN M. J; PARISI M. C. M. Armazenamento refrigerado de morango submetido a altas concentrações de CO2. **Horticultura Brasileira** 30: 688-694. 2012.

DALSASSO, R. L. **Pré-ozonização de águas contendo agrotóxico, seguida de filtração direta**. Florianópolis: UFSC, 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1999.

DAMEZ, F.; LANGLAIS, B.; RAKNESS, K. L.; ROBSON, C. M. Operating an ozonation facility. In: LANGLAIS, G.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. (Ed.). **Ozone in water treatment: Application and engineering**. Lewis Publishers, p. 469-490, 1991.

DANIEL, L. A. (Coord.). **Processo de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável**. São Carlos: Rima, 139 p. 2001.

DI BERNADO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima, 2005. v. 2, 784 p.

DIAS, M. S. C.; CANUTO, R. S.; SANTOS, L. O.; MARTINS, R. N. Doenças do Morango. pp. 40-43. In: EPAMIG. **Doenças pós-colheita**. Informe Agropecuário 26. 2005.

DORBY, S.; LICHTER, A. Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P., DELEN, N. (Eds.), *Botrytis: Biology, pathology and control*. **Dordrecht: Springer**, 2007. p. 223–242.

DUARTE FILHO, J.; CUNHA, R. J. P.; ALVARENGA, D. A.; PEREIRA, G. E.; ANTUNES, L. E. C. Aspectos do florescimento e técnicas empregadas objetivando a produção precoce em morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n°. 198, p. 30-35. 1999.

EFSA, European Food Safety Authority, 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. **EFSA Journal** v.8, p. 1496. 2010.

EMATER-DF. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Distrito Federal. **Produção Agropecuária 2011**. Disponível em: <<http://www.emater.df.gov.br/>> Acesso: 09 de Novembro, 2015.

FALCÃO, J. V. **Qualidade do solo e desempenho econômico do cultivo do morango em Brazlândia, Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 80 p. Dissertação de Mestrado. 2012.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso: 07 de novembro, 2015.

FDA (Food and Drug Administration). Revised, 2013. **Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe**. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1563>>. Acesso em: 03 de novembro, 2015.

FERNANDES, G. R. **Sanitizantes Alternativos na qualidade microbiológica, física e química de morangos minimamente processados**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.

FERNÁNDEZ, A.; NORIEGA, E.; THOMPSON, A. Inactivation of Salmonella enterica serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. **Food Microbiology**, v. 33, p. 24-29, 2013.

FRAIRE-CORDEIRO, M. L.; YÁÑEZ-MORALES, M. J.; ÁNGEL, D. N. Hongos patógenos em fruto defresa (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) em postcosecha. **Revista Mexicana de Fitopatologia**. 33:285-291. 2003.

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

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ateneu, 182p. 2008.

FRANQUEZ, G. G. **Seleção e multiplicação de clones de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.)** 2008. 122p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2008.

FREEMAN, B. **Institute for Food Safety and Health Illinois Institute of Technology**. Disponível em: <[https://www.iit.edu/magazine/spring\\_2011/pdfs/spring11\\_researchbriefs.pdf](https://www.iit.edu/magazine/spring_2011/pdfs/spring11_researchbriefs.pdf)> Berry Health Benefits Symposium Westlake Village CA, 2011. Acesso em: 31/08/2016.

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. 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 microflora e aflatoxinas durante a armazenagem de castanha-do-Brasil com casca (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)**. (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

GLAZE, W. H., KANG, J. W., CHAPIN, D. H. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. **Ozone Science & Engineering**, v. 9, pp. 335-352, 1987.

GONÇALVES, A. A. Ozone – an Emerging Tecnology for the Seafood Industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 52 n.6:pp. 1527-1539, Nov/Dec, 2009.

GRAHAM, D. M, 1997. Use of ozone for food processing. **Food Technol.** 51(6):72-75.

GÜZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, p.453-460, 2004.

HARRISSON, J. F. “Ozone for Point-of Use, Point-of-Entry, and Small Water System Water Treatment Applications” – **A Reference Manual, Water Quality Association**, 86pp, 2000.

HEATON, J.C.; JONES, K. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 613-626, 2008.

HENNION, B.; VESCHAMBRE, D. **La fraise: Maîtrise de la production**. Paris: CTIFL, p.299. 1997.

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. Embrapa Clima Temperado, p.271-282. 2004.

HENZ G. P.; REIS A; SILVA KCC; PEREIRA SF. Incidência de Doenças de Pós-Colheita em Frutos de Morango Produzidos no Distrito Federal. **Brasília: Embrapa Hortaliças**. 13p. 2008.

HENZ, G. P. Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 260-265, 2010.

HOOFF, F. V. Professional risks associated with ozone. In: MASSCHELEIN, W. J. (Ed.). **Ozonation manual for water and waste water treatment**. New York: Wiley-Interscience, p. 200-201. 1982.

HUANG, Y.; YE, M.; CHEN, H. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. in strawberry puree by high hydrostatic pressure with/without subsequent frozen storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p 337-343, 2013.

JELÉN, H. H.; KRAWCZYK, J.; LARSEN, T. O.; JAROSZ, A.; GOLEBNIAK, B. Main compouds responsible for off-odour of strawberries infected by Phithophthora cactorum. **Letter in Applied Microbiology**, v. 40, n.4, p. 255-259, 2005.

JUNIOR, J. O. O.; LAGES, G. V. Ozonioterapia em lombociatalgia. **Artigo de Revisão. Revista Dor**, vol. 13, n° 3. Central da Dor e Estereotaxia do Hospital Antonio Cândido Camargo da Fundação Antonio Prudente (FAP). São Paulo - SP, 2012.



- KHADRE M. A, YOUSEF A. E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal Food Microbiology**. (Forthcoming). 2001b.
- 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, 2001a.
- KIM, J. G. **Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods**. Ph.D. thesis, The Ohio State University, Columbus, OH. 1998.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v.19, p.17-34, 1999b.
- 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, 1999a.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; KHADRE, M. A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research Vol. 45**. Department of Food Science and Tecnology. 2003.
- KLIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres 1997. 706 p.
- KOKKINAKIS. E.; FRAGKIADAKIS. G. A. HACCP effect on micorbiological quality of minimally processed vegetables: a survey in six mass-catering establishments. **International Journal of Food Science and Technology**. v.42. i.1 p.18-23. 2007.
- KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. p. 9-81. 2001.
- KOVACH, J.; PETZOLDT, R.; HARMAN, G. E. Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for botrytis control. **Biology Control**, v.18, p. 235-242, 2000.
- KRAMER, A. Fruits and Vegetables. In: TWIGG, B. A. **Quality control for food industry**. Connecticut: AVI Publishing Company, v.2, p. 157-227. 1973.
- LAHLALI, R., SERRHINI, M. N., FRIEL, D., JIJAKLI, M. H. Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p.1-9, 2007.
- LAZAROVA, V.; SAVOYE, P.; JANEX, M. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. **Water Science Technology**, London, v. 40, n. 4-5, p. 201-213, 1999.

- LELIEVELD, H. L. M.; MOSTERT, M. A.; HOLAH, J.; WHITE, B. **Hygiene in food processing**. Boca Raton: CRC Press, 421p. 2003.
- LEMAITRE, R.; LINDEN, R. *Le fraisier à gros fruits: description et identification de variétés*. Gembloux, J. Duculot, 234p. 1968.
- LIU, G.; KENNEDY, R.; GREENSHIELDS, D. L.; PENG, G.; FORSEILLE, L.; SELVARAJ, G.; WEI, Y. Detached and Attached Arabidopsis Leaf Assays Reveal Distinctive Defense Responses Against Hemibiotrophic *Colletotrichum* spp. **Molecular Plant-Microbe Interactions** , p. 1308-1319, 2007.
- LOPES HRD; SILVA BC; NASCIMENTO EF; RAMOS LX; PEREIRA M; CARNEIRO RG. 2005. **A cultura do morangueiro no Distrito Federal**. Brasília: EMATER. 76p.
- LOPES, U. P. **Podridões pós-colheita de morango: Etiologia e efeito de produtos alternativos**. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. Dissertação de Mestrado. Fevereiro de 2011.
- LORENZETTI, E. R. **Controle de doenças do morangueiro com óleos essenciais e *Trichoderma* spp.** 2012. 107 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras M G. 2012.
- LUCENA, E. M. P. de. **Desenvolvimento e maturidade fisiológica de manga “Tommy Atkins” no vale do São Francisco**. 2006. 152 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- MAAS, J. L. **Compendium of strawberry diseases**. 2º Edição. Betsville: APS Press/USDA, 98p. 1998.
- MAAS, J. L. Compendium of Strawberry Diseases. **American Phytopathological Society**, St. Paul, 1984 MN.
- MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A.; GROVE, G. G.; REYNOLDS, K. M.; WILSON, L. L.; 1991. Epidemiology and control of leather rot of strawberries. **Plant Diseases**, v. 75, p. 39–445, 1991.
- MAHMOUND, A.; FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, pp.198-205, 2007.
- MATTOS, M. L. T. **Segurança Alimentar: O caso do morango**. In RASEIRA, M.; ANTUNES, L; TREVISAN, R; DIAS, E. G. 2º Simpósio Nacional do morango e 1º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas. EMBRAPA 2004.
- 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.

MONTERO, T. M.; MOLLÁ, E. M.; ESTEBAN, R. M.; ANDRÉU, F. J. L. Quality attributes of strawberry during ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 65, p. 239-250, 1996.

MORETTI, C. L. **Manuseio pós-colheita, compostos funcionais e logística de distribuição de morangos**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 4.; ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2008, Pelotas (RS). Palestras & resumos... Pelotas: Embrapa Clima Temperado.

MORETTI, C. L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília: Embrapa Frutas e Hortaliças e SEBRAE. 531p. 2007.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 Ed. p. 183-193. 2001.

NAITO, S.; TAKAHARA, H. Ozone contribution in food industry in Japan. **Ozone: Science & Engineering**, 28, 425-9. 2006.

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.

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. p. 185-193. 2007.

OFFIT, P. A. J.; MOSER, C. A. **The problem with Dr Bob's alternative vaccine schedule**. Pediatrics, v. 123, p. 164-170, 2009.

OIE, S.; KIYONAGA, H.; MATSUZAKA, Y.; MAEDA, K.; MASUDA, Y.; TASAKA, K.; ARITOMI, S.; YAMASHITA, A.; KAMIYA, A. **Microbial Contamination of Fruit and Vegetables and Their Disinfection Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v.31, i.10, p.1902-1905. 2008.

OLIVEIRA, A. C. B.; BONOW, S. **Novos desafios para o melhoramento genético da cultura do morangueiro no Brasil**. Pequenas Frutas: tecnologias de produção. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.33, n.268, p.21 - 26, maio/jun. 2012.

OLIVEIRA, R. M.; WOSHC, C. L. Ozonólise: A busca por um Mecanismo. **Química Nova**. Vol. 35, No. 7, 1482-1485, 2012.

ÖLMEZ, H.; KRETZSCHMAR, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, I.3, p. 686–693, 2009.

OSHITA, D.; JARDIM, S.F.C.I. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna, **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p. 52-76, 2012.

OSKAN, R.; SMILANICK, J.L.; KARABULUT, O.A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.60, p.47-51, 2011.

ÖZTEKIN, S.; ZORLUGENC, B.; ZORLUGENC, F.K. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.396–399, 2006.

PATIL, S.; VALDRAMISIS, V.; FRIAS, J. M.; CULLEN, P.; BOURKE, P. Ozone inactivation of acid stressed *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in orange juice using a bubble column. **Food Control**, v.21, n.13, p.1723-1730, 2010.

PEREIRA, A. M.; **Processo de ozonização: eficácia biológica, qualidade dos grãos e análise econômica**. Dissertação de Mestrado. UFV, 2006.

PINELI, L. L. O. **Qualidade e potencial antioxidante in vitro de morangos in natura e submetidos a processamentos**. 2009. 222 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2009.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 519p. 2009.

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.

PRESTES, E. B. **Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas**. 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

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.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; PASSOS, F. A.; SANTOS, R. R. Caracterização Botânica de Cultivares de Morangueiro. **Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)**, 1996. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v55n1/04.pdf>> Acesso: 09 de Novembro, 2015.

RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; STEPONAVIČIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVIČIENĖ, A.; ZVICEVIČIUS, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.13, n.2, p.287-294, 2006.

REIS, A.; COSTA, H. Principais doenças do morangueiro no Brasil e seu controle. **EMBRAPA Circular Técnica 96**. Brasília DF. 9 p. 2011.

RESENDE, L. M. A.; MASCARENHAS, M. H. T.; PAIVA, B. M. Panorama da produção e comercialização do morango. **Informe Agropecuário**, v.20, n.º. 198, p. 5-19, 1999.

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**, Denver, v. 73, n. 1, p. 44-47, 1981.

RICHARDSON, S. D. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.22, n. 10, p. 666-684, 2003.

RICHARDSON, S. D.; THRUSTON J. R.; CAUGHRAN, T. V.; CHEN, P. H.; COLLETTE, T. W.; SCHENCK, K. M.; LYKINS JR. B. W.; RAV-ACHA, C.; GLEZER, V. Identification of new drinking water disinfection by-products from ozone, chlorine dioxide, chloramine, and chlorine. **Water, Air, and Soil Pollution, Dordrecht**, v. 123, n. 1/4, p. 95-102, 2000.

RIDEAL, E. K. The Manufacture of Chemicals by Electrolysis. Ozone, 1920. University of Illinois. **Digitized by the Internet Archive in 2007 with funding from Microsoft Corporation**. Disponível em: <<https://archive.org/details/ozonerid00rideuoft>>. Acesso em: 27/10/2015.

RONQUE, E. R. V. **A cultura do morangueiro: revisão e prática**. Paraná: EMATER, 206p. 1998.

RUBIN M. B. History of Ozone. Part III. C.D. **Harries and the introduction of ozone into organic chemistry**. *Helv Chim Acta*, 86, 930-940. 2003.

SANHUEZA, R. M. V.; HOFFMAN, A.; ANTUNES, L. S. C.; FREIRE, J. M. Sistema de Produção de Morango para Mesa da Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste. Importância da Cultura. **Sistema de Produção**. Versão Eletrônica. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 31/08/2016.

SANTOS, A. M. Melhoramento genético do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20 n.º 198, p. 24-29. 1999.

SANTOS, J. E. **Difusão e cinética de Decomposição do Ozônio no Processo de Fumigação de Grãos de Milho (*Zea mays*)**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

SEERAM, N.P.; LEE, R.; SCHEULLER, H.S.; HEBER, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatographic analysis of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 97, p.1–11, 2006.

SHAMAILA, M.; BAUMANN, T. E.; EATON, G. W.; POWRIE, W. D.; SKURA, B. J. Quality attributes of strawberry cultivars grown in British Columbia, **Journal of Food Science, Chicago**, v. 57, n. 3, p. 696-699, 1992.

SHAW, D. V. Response to selection and associated changes in genetic variance for soluble solids and titratable acids contents in strawberries. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n.5, p. 839-843, 1990.

SILVA, F. L.; ESCRIBANO – BAILÓN, M.T.; ALONSO, J.J.; RIVAS-GONZALO, J.C.; SANTOS-BUELGA, C. Anthocyanin pigments in strawberry LWT. **Food Science and Technology**. v.40, p. 374-382, 2007.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; Prá, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. Ciências Agrárias, **Ciências de Alimentos**. v.32, p.659-682, 2011.

SILVA, T. P. **Características produtivas e físico-químicas de frutos de morangueiro orgânico cultivado com o uso de extrato de algas**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Paraná, Curitiba, PR. 2011.

SILVEIRA, I. C. T. **Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos em DAPHNIA SIMILIS**. Dissertação (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

SIQUEIRA, R. S.; BORGES, M. F. **Microbiologia de frutas e produtos derivados**. In: TORREZAN, R. (Coord.). Curso de processamento de frutas. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CTAA, p. 2-13. 1997.

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.

SOPHER, C. D.; GRAHAM, D. M.; RICE, R. G.; STRASSER, J.H. Studies on the Use of Ozone in Production Agriculture and Food Processing. **Proceedings of the International Ozone Association**. Pan American Group, p.15. 2002.

SOUSA, A. H.; FARONI, L. R. D.; GUEDES, R. N. C.; TÓTOLA, M. R.; URRUCHI, W. I. Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect-pests of stored products. **Journal of Stored Products Research**. v.44, p.379-385, 2008.

SPECHT, S. **O Território do Morango no Vale do Caí – RS : análise pela perspectiva dos sistemas agroalimentares localizados**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Ciências Econômicas, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Rural, Porto Alegre, 2009.

SREENIVASAPRASAD, S.; TALHINHAS, P. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. **Molecular Plant Pathology** . v. 6., p. 361-378, 2005.

STAUDT, G. Taxonomic studies in the genus *Fragaria*. Typification of the *Fragaria* species known at the time of Linnaeus. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 40:869-886, 1962.

STAUDT, G. The species of *Fragaria*, their taxonomy and geographical distribution. In: **ACTA HORTICULTURAE, 265, and INTERNATIONAL STRAWBERRY SUMPOSIUM**. Cesena, 1989. Proceedings. Bologna, International Society for Horticultura Science. p.23-33. 1989.

STEENSTRUP, L.D.; FLOROS, J. Inactivation of E. coli O157:H7 in apple cider by ozone at various temperatures and concentrations. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 28, n. 2, p. 103–116, 2004.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference** ed. 13 (2002). p. 215-225. 2002.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos - ocorrência e detecção**. Campinas, 82 p., 2001.

TÖFOLI, J. G.; FERRARI, J. T.; DOMINGUES, R. J. *Botrytis* sp. em espécies hortícolas: hospedeiros, sintomas e manejo. **Biológico, São Paulo**, v.73, n.1, p.11-20, 2011.

TOLEDO, M., **Guia para a Produção de Morango de Honduras**. Fundação Hondureña de Pesquisa Agrícola (FHIA). 36 p. 2003.

TORLAC, E.; SERT, D.; ULCA, P. Efficacy of gaseous ozone against Salmonella and microbial population on dried oregano. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, n.3, p. 276-280, 2013.

TORLAK, E.; SERT, D.; ULCA, P. Efficacy of gaseous ozone against Salmonella and microbial population on dried oregano. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 276-280, 2013.

TRAMBARULO, R.; GHOSH, S. N.; BURRUS, C. A.; JR AND GORDY, W. The molecular structure, dipole moment, and g factor of ozone from its microwave spectrum. **J. Chem, Phys.** **21.** 851-855. 1953.

VANETTI, M.C.D. Microbiologia. In: MORETTI, C.L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças.** Brasília: Embrapa Frutas e Hortaliças e SEBRAE. 2007.

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

WHANGCHAI, K.; SAENGNIL, K.; UTHAIBUTRA, J. Effect of ozone in combination with some organic acids on the control of postharvest decay and pericarp browning of longan fruit. **Crop Protection**, v.25, p.821–825, 2006.

WHITE, G. C. (1999) Handbook of chlorination and alternative disinfectants. **Van Nostrand Company**, New York, NY, 4th ed.

WILEY,R.C.(Ed). **Frutas y hortalizas minimamente procesadas y refrigeradas.** Madrid: Acribia, 362p. 1997.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. Postharvest: an introduction to the physiology & handling of fruit, vegetables & ornamentals. 4. Ed. Wallingford: New South Wales University Press, 262p. 1998.

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.

WYSOK, B.; URADZIŃSKI, J.; GOMÓKA-PAWLICHKA, M. Ozone as an alternative disinfectant – A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.15, p.3-8, 2006.

YANG, X.; WANG, H. *Escherichia coli* – Pathogenic E. coli. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 695-701, 2014.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças do morangueiro. pp. 55-80. CARVALHO, S. P. (coord). **Boletim do Morango: Cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico.** Belo Horizonte: FAENG. 2006.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças do morangueiro. In: CARVALHO, S. P. (Coord.). **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico.** Belo Horizonte: CEASA Minas, 2005. p. 55-96. 2005.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; CRUZ FILHO, J.; CHAVES, G. M. **Emprego da calda Viçosa na cultura do tomateiro (*L. esculentum*) para o controle de doenças da parte aérea.** (Informe Técnico 66)., 1990.



ZHANG, H.; LONGCHUAN, M.; TURNER, M.; XU, H.; ZHENG, X.; DONG, Y.; JIANG, S. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* against postharvest *Rhizopus* rot of strawberries and the possible mechanisms involved. **Food Chemistry**, v.122, p. 577-583, 2010.

ZOTTI, M.; PORRO, R.; VIZZINI, A.; MARIOTTI, M.G. Inactivation of *Aspergillus* spp. by ozone treatment. **Ozone-Science & Engineering**, v.30, n.6; p.423-430, 2008.

# **CAPÍTULO I**

## **INFLUÊNCIA DO PH NA EFICÁCIA DA ÁGUA OZONIZADA NO CONTROLE DE MICORGANISMOS E EFEITO NA QUALIDADE FÍSICO- QUÍMICA EM MORANGO ARMAZENADO**

# INFLUÊNCIA DO PH NA EFICÁCIA DA ÁGUA OZONIZADA NO CONTROLE DE MICORGANISMOS E EFEITO NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA EM MORANGO ARMAZENADO

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência do pH na eficácia da água ozonizada para inativação de microrganismos na pós-colheita de morango, além de avaliar possíveis efeitos na qualidade físico-química durante o armazenamento. Utilizaram-se morangos da variedade "Portola", adquiridos de um produtor da região administrativa de Brazlândia – Distrito Federal. Para avaliar a influência do pH na água ozonizada, os morangos foram divididos em seis lotes, três lotes em que o gás ozônio foi dissolvido na água na concentração de  $21 \text{ mg L}^{-1}$  por 15 min de borbulhamento e três lotes em que não foi ozonizada, correspondendo aos tratamentos: água destilada ozonizada com pH 3,0 e concentração de ozônio na água de  $0,11 \text{ mg L}^{-1}$ , água destilada ozonizada com pH 6,5 e concentração de ozônio na água de  $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ , água destilada ozonizada com pH 8,7 e concentração de ozônio na água de  $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ ; os outros três tratamentos foram testemunhas, água destilada com pH 3,0, 6,5 e 8,7. Para se chegar ao valor de pH 3,0 utilizou-se ácido cítrico e para o valor de pH 8,7 utilizou-se bicarbonato de sódio, o pH 6,5 não foi alterado. O tempo de imersão em todos os tratamentos foi de 5 min. Após essa etapa os morangos foram armazenados em câmara fria a  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 6 dias. As análises dos frutos foram realizadas no dia da ozonização (tempo zero) e a cada dois dias até o sexto dia de armazenamento. Na etapa microbiológica foi avaliada a presença de *Salmonella* spp., coliformes totais, *E. coli*, bolores e leveduras e aeróbios mesófilos, todos expressos em log (UFC  $\text{g}^{-1}$ ). As variáveis qualitativas avaliadas foram: perda de massa fresca, pH, acidez total titulável, teor de sólidos solúveis, relação SST/ATT e coloração. Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial 6x4, sendo seis tratamentos e quatro períodos de armazenamento (0, 2, 4 e 6), com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância e posteriormente análise de regressão. Verificou-se que o pH influenciou a eficiência da água ozonizada no controle de microrganismos indesejáveis em morangos durante o armazenamento. No que se refere à qualidade físico-química dos morangos, a água ozonizada foi capaz de retardar a perda de massa fresca, manter os níveis de pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, relação SST/ATT e das variáveis referentes à cor. Concluiu-se que a utilização

de água ozonizada na manutenção de morango armazenado e na indústria alimentícia pode ser uma alternativa promissora.

**Palavras-chave:** *Ozônio; Microrganismos deteriorantes; Microrganismos patogênicos; Alterações qualitativas.*

PH INFLUENCE ON THE EFFICACY OF OZONIZED WATER IN THE CONTROL OF MICROORGANISMS AND EFFECT ON THE PHYSICAL-CHEMICAL QUALITY IN STRAWBERRY STORAGE

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the influence of pH on the efficacy of ozonated water for inactivation of microorganisms in strawberry post-harvest, and to evaluate possible effects on the physical-chemical quality during storage. Strawberries of the "Portola" variety, purchased from a producer in the administrative region of Brazlândia - Distrito Federal, were used. To assess the influence of pH on ozonated water, strawberries were divided into six batches, three batches in which the ozone gas was dissolved in the water at a concentration of 21 mg L<sup>-1</sup> for 15 min of bubbling and three batches in which it was not ozonated, Corresponding to the treatments: ozonized distilled water with pH 3.0 and ozone concentration in water of 0.11 mg L<sup>-1</sup>, ozonated distilled water with pH 6.5 and ozone concentration in water of 0.08 mg L<sup>-1</sup>, ozonated distilled water with pH 8.7 and ozone concentration in the water of 0.04 mg L<sup>-1</sup>; the other three treatments were controls, distilled water with pH 3.0, 6.5 and 8.7. In order to reach pH 3.0, citric acid was used and sodium bicarbonate was used for pH 8.7, pH 6.5 was not altered. The immersion time in all treatments was 5 min. After this stage the strawberries were stored in a cold room at 5 °C for 6 days. The fruits were analyzed on the day of ozonation (zero time) and every two days until the sixth day of storage. In the microbiological stage, the presence of *Salmonella* spp., Total coliforms, *E. coli*, molds and yeasts and aerobic mesophiles, all expressed in log (UFC g<sup>-1</sup>), were evaluated. The qualitative variables evaluated were: fresh weight loss, pH, total titratable acidity, soluble solids content, ratio and staining. A completely randomized design was used in a 6x4 factorial scheme, with six treatments and four storage periods (0, 2, 4 and 6), with three replications. Initially, analysis of variance and regression analysis were performed. It was found that pH influenced the efficiency of ozonated water in the control of undesirable microorganisms in strawberries during storage. As regards the physico-chemical quality of strawberries, ozonated water was able to delay the loss of fresh mass, maintain pH levels, total soluble solids, titratable total acidity, ratio and color variables. It was concluded that the use of ozonated water in the maintenance of stored strawberry and in the food industry can be a promising alternative.

**Keywords:** *Ozone; Deteriorating microorganisms; Pathogenic microorganisms; Qualitative changes.*

## 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de morango no ano de 2012 foi de aproximadamente 4,52 milhões de toneladas, tendo o Brasil correspondido com uma produção de 133 mil toneladas (FAO, 2014). O morango é uma das principais culturas olerícolas no contexto social e econômico do Distrito Federal, com uma área cultivada de aproximadamente 6.500 hectares/ano (FALCÃO, 2012).

Determinadas frutas e hortaliças são altamente perecíveis devido ao alto teor de água em sua composição química, o que faz a pós-colheita fator limitante e extremamente importante no processo de industrialização. É importante conhecer e utilizar de maneira correta as práticas adequadas de manuseio durante as fases de colheita, pós-colheita, armazenamento, transporte, distribuição, comercialização e consumo, para que o tempo de conservação seja maximizado e ocorra redução das perdas pós-colheita mantendo frutas e hortaliças conservadas para um tempo maior de consumo (FREITAS-SILVA et al., 2013).

O morango destaca-se por ser um produto altamente perecível no mercado *in natura*, requer a utilização de tecnologia adequada para melhor conservação e redução de perdas pós-colheita. Os métodos de sanitização são utilizados como parte da cadeia produtiva na conservação e sanidade do produto até a chegada ao consumidor. Atualmente o cloro e seus produtos derivados são os mais utilizados na higienização das verduras e frutas. A legislação brasileira tem aceitado o uso do cloro na sanitização dos alimentos, na etapa pós-colheita, entretanto alguns países da Europa como Holanda, Alemanha, Dinamarca, Suíça e Bélgica o uso de produtos clorados em alimentos frescos foi proibido. Os compostos clorados possuem algumas desvantagens no tratamento de água e na indústria de alimentos, pois este processo pode conduzir à formação de compostos organoclorados, trihalometanos e ácidos haloacéticos, que são mutagênicos, tóxicos e carcinogênicos em água, em alimentos e/ou superfícies de contato (LAZAROVA et al., 1999; PRESTES, 2007; SILVA et al., 2011).

É essencial o estudo de alternativas ao cloro, que sejam eficientes na inativação de microrganismos, que não afete as qualidades físico-químicas e que não representem risco aos consumidores. O ozonização tem sido proposta como alternativa da qualidade pós-colheita de produtos de origem vegetal. O gás ozônio, forma molecular triatômica do oxigênio, foi declarado como uma substância reconhecidamente segura (GRAS – "Generally Reconined as Safe"), pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1982,

sendo seu uso permitido apenas como sanificante para água engarrafada. Alguns anos mais tarde, em 2001, a utilização do ozônio como aditivo direto em alimentos foi permitido pelo FDA; tendo sido amplamente pesquisado e utilizado na indústria de alimentos, tanto como forma de limpeza de superfícies como no tratamento da matéria-prima, assim o uso como agente antimicrobiano no tratamento, armazenamento e etapas de processamento de alimentos (GRAHAM, 1997; KIM et al., 1999; SOPHER et al., 2002; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; FDA, 2013).

A eficiência do gás ozônio como sanitizante é bem evidenciada e seu papel como um potente oxidante já é conhecido desde o início do século XX com o tratamento de água, entretanto, devido à facilidade e o preço mais em conta, os produtos clorados tomaram conta do cenário mundial, pois, no começo do século, a produção do gás ozônio era uma tecnologia cara devido à alta demanda energética. Contudo, nestes últimos anos, o ozônio adquiriu novamente importância no cenário mundial, quando a busca por sustentabilidade e tecnologias que agridem menos o meio ambiente e a saúde humana têm se tornado prioridades. O uso sustentável da água é o maior exemplo e, devido às características do ozônio – possuir um alto poder oxidativo e não deixar resíduos – torna-se uma ótima alternativa para um problema que cresce cada vez mais: o uso racional da água.

São muitas as utilizações da água ozonizada no processo de pós-colheita do morango, assim como de outras frutas e hortaliças, incluindo tratamentos para controlar infecções de patógenos e os seus propágulos nos vegetais, saneamento de água em sistemas de lavagem, tanques de descarga ou canais, saneamento das superfícies de equipamentos além de embalagens. Entretanto, a ozonização da água vai depender de diversos fatores, tais como: cinética de decomposição em meio aquoso, teor de matéria orgânica na água, temperatura da água e principalmente o pH do meio. As alterações na eficiência do processo de desinfecção, quando há uma representativa variação no pH do meio, relacionam-se com mudanças na taxa de decomposição do ozônio (KIM et al., 2003; DI BERNADO e DANTAS, 2005).

Diante do contexto apresentado, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência do pH na eficácia da água ozonizada na inativação de microrganismos como alternativa no processo de sanitização em morangos, além de avaliar possíveis alterações físico-químicas ao longo do armazenamento.



## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Vegetais, no Laboratório de Análises de Leite e Derivados e no Laboratório de Análise de Alimentos, localizados na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília.

### **2.1 Origem e tratamento prévio das amostras**

Os morangos da variedade "Portola" foram adquiridos diretamente de um produtor da região administrativa de Brazlândia – Distrito Federal, no dia 09 de agosto de 2016. Na produção do morango não eram utilizados agroquímicos para o controle de pragas e doenças. Entretanto, esses morangos não são considerados orgânicos, pois o produtor faz uso de adubação química, porém é uma adubação considerada equilibrada e sem o uso de adubação nitrogenada.

Os morangos foram colhidos pela manhã no estágio de maturação comercial e transportados à tarde para o Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Vegetais, mantidos em refrigeração a 5 °C, por um período de aproximadamente 12 horas. Todas as etapas do experimento foram realizadas pela manhã. Os morangos foram devidamente selecionados, sendo descartados frutos com lesões e/ou ferimentos. Na ozonização, utilizaram-se somente frutos sadios, uniformes e sem defeito.

### **2.2 Geração do gás ozônio**

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio (Modelo 0&L 5.0 RM) baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD) – efeito corona. 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 (Figura 1). 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 gás ozônio (O<sub>3</sub>).

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.

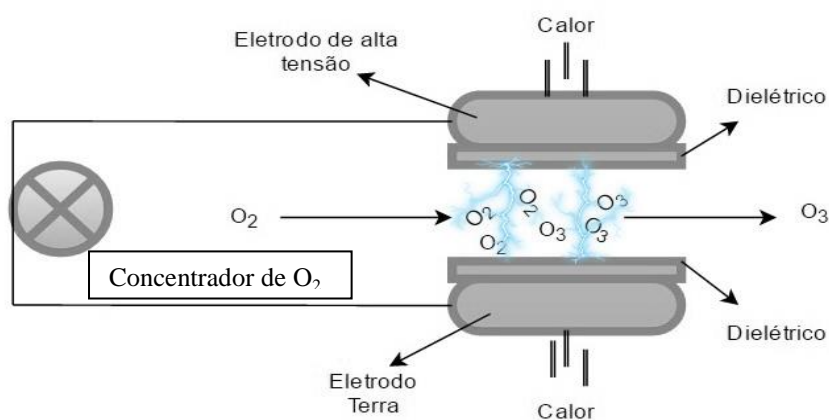


Figura 1 - Representação esquemática do princípio de geração do gás ozônio baseada no método DBD – Descarga por Barreira Dielétrica. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 2.3 Obtenção da água ozonizada

Foi utilizada água destilada com três diferentes pH's:

- pH 3,0 (ácido) – adicionou-se ácido cítrico (p.a) até chegar no valor desejado;
- pH 6,5 – pH natural da água;
- pH 8,7 (alcalino) – adicionou-se bicarbonato de sódio (p.a) até chegar no valor desejado.

A medição do pH foi realizada com potenciômetro Digimed Mod. DM21.

Na obtenção da água ozonizada com diferentes pH's, efetuou-se o borbulhamento do gás por 15 min na concentração de  $21 \text{ mg L}^{-1}$ , vazão de  $1,0 \text{ L min}^{-1}$ , na temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para a ozonização, as amostras água com o diferentes pH's foram acondicionadas em recipientes de vidro com capacidade de 1,5 L, dotado de placa porosa.

### 2.4 Quantificação do ozônio dissolvido na água

A quantificação do ozônio dissolvido na água foi realizada em fotômetro SAM CHEMetrics, Modelo I-2019, com faixa de medição de  $0,01$  a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

## **2.5 Tratamento dos morangos com água ozonizada**

Os frutos, devidamente selecionados, foram divididos em seis lotes. Cada lote correspondeu a um tratamento, sendo três tratamentos com água ozonizada e três tratamentos com água não ozonizada, nos diferentes pH's. Os tratamentos foram identificados da seguinte forma:

- C1 – Água destilada ozonizada em pH 3,0;
- C2 – Água destilada ozonizada em pH 6,5;
- C3 – Água destilada ozonizada em pH 8,7;
- A1 – Água destilada em pH 3,0;
- A2 – Água destilada em pH 6,5;
- A3 – Água destilada em pH 8,7.

As concentrações de ozônio dissolvido na água com valores de pH iguais a 3,0, 6,5 e 8,7 foram equivalentes a 0,11, 0,08 e 0,04 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Inicialmente os frutos foram acondicionados em recipiente de vidro com capacidade de 3,0 L e imersos em água ozonizada ou não, com os respectivos pH's. O tempo de imersão foi de 5 min para todos os tratamentos. Finalizado esse período, efetuou-se a drenagem da água. Em seguida, os frutos foram acondicionados em embalagens de polietileno retangulares (18 cm x 12 cm), transparentes e identificados de acordo com cada tratamento, com 3 repetições. Em cada uma das embalagens foram colocados aproximadamente 100 g de morango. Armazenaram-se em câmara climática tipo B.O.D. na temperatura de 5±1 °C.

Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas imediatamente após a imersão dos frutos na água ozonizada ou não, e a cada dois dias, até seis dias de armazenamento. Ressalta-se que foram realizadas análises microbiológicas dos frutos antes da imersão em água ozonizada ou não.

## **2.6 Análises microbiológicas dos morangos**

### **2.6.1 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 destas análises microbiológicas. A solução com água peptonada correspondeu à diluição

de  $10^{-1}$  e a partir desta diluição foram feitas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , em solução salina 0,85% (NaCl).

Para contagem de bolores e leveduras (YM), aeróbios mesófilos (AC) e coliformes totais e *Escherichia coli* (EC) utilizou-se o sistema Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA), conforme orientação do fabricante. Destaca-se que essa técnica foi testada em morango fresco por Jordano et al. (1995) para esses microrganismos, sendo obtido resultado satisfatório. Para a contagem *Salmonella* spp., utilizou-se o protocolo descrito pela Instrução Normativa número 62, do Ministério da Agricultura. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama (UFC g<sup>-1</sup>).

## **2.6.2 Detecção de microrganismos utilizando o sistema Petrifilm™**

### **2.6.2.1 Contagem de Coliformes totais e *E. coli* (Petrifilm™ EC 6404)**

Para contagem de Coliformes totais e fecais utilizou-se a diluição de  $10^{-1}$ , e o Método Oficial AOAC® 991.14, descrito para alimentos, com incubação de 24h ± 2h para coliformes totais a 35°C ± 1°C (AOAC, 2002). Para contagem de *E. coli*, as condições de incubação foram 35 ± 1 °C por 48 ± 2h. Os resultados obtidos foram expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC g<sup>-1</sup>), posteriormente em log UFC g<sup>-1</sup>.

### **2.6.2.2 Contagem de Aeróbios Mesófilos (Petrifilm™ AC)**

Na contagem de Aeróbios Mesófilos utilizou-se o sistema Petrifilm™ AC, nas diluições de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . A incubação das placas seguiu o Método Oficial AOAC® 990.12 – Contagem de Aeróbios em Placas de Alimentos, Filme Reidratável Seco, com incubação por 48h ± 3h a 35°C ± 1°C (AOAC, 2002).

### **2.6.2.3 Contagem de Bolores e Leveduras (Petrifilm™ YM)**

Para contagem de Bolores e Leveduras utilizou-se o sistema Petrifilm™ YM, nas diluições de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . A incubação das placas seguiu o Método Oficial AOAC® 997.02 – Contagem de Bolores e Leveduras em Alimentos, com incubação de 5 dias a 20°C – 25°C (AOAC, 2002). Os resultados obtidos foram expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC g<sup>-1</sup>), posteriormente em log UFC g<sup>-1</sup>.

#### **2.6.2.4 *Salmonella* spp.**

A partir da diluição de  $10^{-1}$  foram transferidos 1 mL para tubos com 10 mL de caldo selenito cistina (Fluka Analytical) e 0,1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Acumedia), os quais foram incubados a  $42 \pm 0,2$  °C, durante 24 horas, para o enriquecimento seletivo. A etapa seguinte foi o plaqueamento diferencial, em placas contendo Agar *Salmonella* Shigella (Acumedia) que foram incubadas a  $35 \pm 2$  °C, durante 24 horas para confirmar a presença de *Salmonella* spp. As placas com colônias suspeitas *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 na IN N.º.62/2003 (BRASIL, 2003). Os critérios microbiológicos adotados foram os contidos na RDC 12/2001 (BRASIL, 2001).

## **2.7 Avaliação da qualidade físico-química dos morangos**

### **2.7.1 Perda de Massa Fresca (PMF)**

A perda de massa fresca foi estimada, em porcentagem (%), pela diferença da massa registrada no momento no início do experimento (dia zero) e os diferentes dias de armazenamento (2, 4 e 6 dias). A perda de massa foi calculada utilizando-se a Equação 1:

$$Perda\ de\ Massa\ (\%) = \frac{M_i - M_f}{M_i} 100 \quad \text{Equação 1.}$$

### **2.7.2 Potencial Hidrogênionico (pH)**

O pH foi determinado com o potenciômetro Digimed Mod. DM21. Utilizou-se aproximadamente 10 gramas de amostra triturada e homogeneizada em 100 mL de água destilada.

### 2.7.3 Acidez Total Titulável

A análise de acidez titulável foi determinada conforme a normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2008). Utilizou-se aproximadamente 10 gramas de amostra triturada e homogeneizada em 100 mL de água destilada. Efetuou-se a titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N padronizada até o ponto de viragem equivalente a pH 8,2, utilizando-se potenciômetro Digimed Mod. DM21. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

### 2.7.4 Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os sólidos solúveis totais foram determinados no refratômetro digital Atago (Modelo 1T). Os resultados foram expressos em °Brix, segundo AOAC (2002).

### 2.7.5 Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT)

A partir dos valores obtidos referentes a Sólidos Solúveis Totais e Acidez Titulável foi possível a obtenção da relação SST/ATT – conhecida também como *Ratio*.

### 2.7.6 Coloração dos Morangos

A cor do morango foi avaliada usando o 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. Foram obtidos os valores de um sistema de coordenadas Lab Hunter que define a cor em termos de L, a e b – luminosidade (L); a = verde (-) x vermelho (+); b= azul (-) x amarelo (+) (FERREIRA et al., 1999).

Com os valores das coordenadas L, a e b foi possível obter parâmetros relacionados à saturação da cor ou croma (C), Equação 2, à tonalidade (h), Equação 3, e diferença de cor ( $\Delta E$ ), Equação 4 (LITTLE, 1975, FRANCIS, 1975, MCLELLAN et al., 1995, MASKAN, 2001).

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

$$h = \arctang (b/a) \quad (3).$$

$$\Delta E = \sqrt{[(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2]} \quad (4).$$

Em que:

$h$  = tonalidade da cor;

$C$  = saturação da cor ou croma;

$a$  = 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 os valores obtidos no tempo zero.

## **2.8 Delineamento Experimental**

Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado em Esquema Fatorial 6x4, sendo seis 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. Utilizou-se o ASSISTAT 7.7 na análise de variância e o software SigmaPlot v. 10 para a obtenção das equações e plotagem dos gráficos.

### 3. RESULTADOS

Com relação à qualidade microbiológica dos morangos antes da imersão em água ozonizada ou não, foram obtidas contagens equivalentes a 6,7 e 5,2 ciclos log, para aeróbios mesófilos e bolores e leveduras, respectivamente. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp., nem quantificada coliformes totais e *E. coli*.

Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) para contagem de aeróbios mesófilos em decorrência da interação tratamento e período de armazenamento de morangos imersos por 5 minutos em água ozonizada ou não com diferentes pH's. Encontram-se na Figura 2 as curvas referentes à contagem de aeróbios mesófilos log (UFC g<sup>-1</sup>) em morangos submetidos à água ozonizada ou não em diferentes pH's. As equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de aeróbios mesófilos em morangos imersos em água ozonizada e não ozonizada estão na Tabela 1.

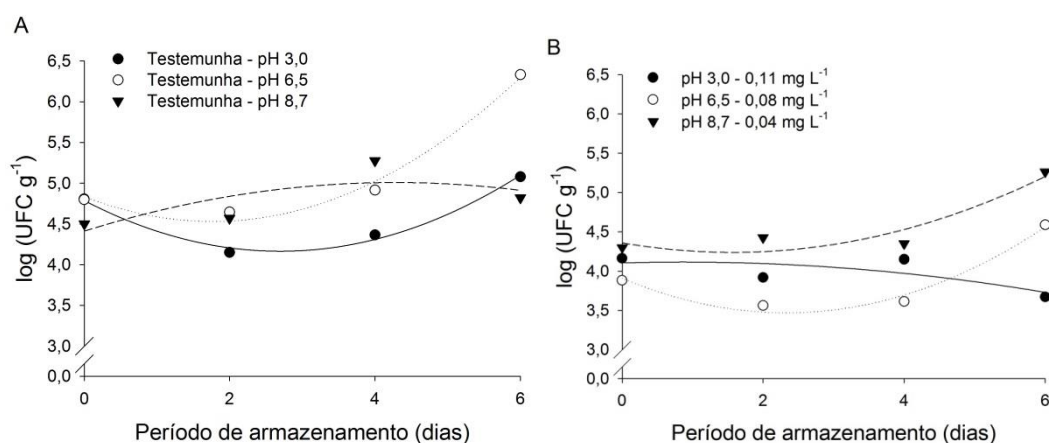


Figura 2 – Contagem de aeróbios mesófilos log (UFC g<sup>-1</sup>) em (A) Morangos imersos em água com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C. (B): Morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C.



Tabela 1 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à contagem de aeróbios mesófilos em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C

| Tratamento                        | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|-----------------------------------|--|----------------|
| Testemunha – pH 3,0               | $\hat{y} = 4,7870 - 0,4614X + 0,0855X^2$ | 0,99           |
| Testemunha – pH 6,5               | $\hat{y} = 4,8346 - 0,3458X + 0,0982X^2$ | 0,99           |
| Testemunha – pH 8,7               | $\hat{y} = 4,4116 + 0,2786X - 0,0325X^2$ | 0,56           |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> em pH 3,0 | $\hat{y} = 4,1050 + 0,0251X - 0,0146X^2$ | 0,57           |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> em pH 6,5 | $\hat{y} = 3,9107 - 0,3778X + 0,0810X^2$ | 0,98           |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> em pH 8,7 | $\hat{y} = 4,3606 - 0,1543X + 0,0491X^2$ | 0,89           |

Em geral, verificou-se menor contagem de aeróbios mesófilos nos frutos de morango imersos em água ozonizada, exceto quando se compararam os resultados obtidos nos frutos imersos em água ozonizada com pH 8,7, com os relativos resultados aos frutos imersos em água não ozonizada com o mesmo pH. A maior diferença observada no sexto dia de armazenamento foi verificada quando se comparou a contagem de aeróbios mesófilos nos frutos imersos em água ozonizada com pH 3,0 (3,7 ciclos log), com o resultado verificado no produto imerso em água não ozonizada com pH 6,5 (6,3 ciclos log), acarretando diferença de 2,6 ciclos log. Salienta-se que todos os tratamentos possibilitaram contagens de aeróbios mesófilos inferior a obtida nos frutos antes imersão em água, que foi equivalente a 6,7 ciclos log.

Obteve-se diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em decorrência da interação tratamento e período de armazenamento para a contagem de bolores e leveduras (log UFC g<sup>-1</sup>) em morangos imersos por 5 min em água ozonizada ou não com diferentes pH's (Figura 3). Na Tabela 2 são apresentadas as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de bolores e leveduras em morangos imersos em água ozonizada e não ozonizada.

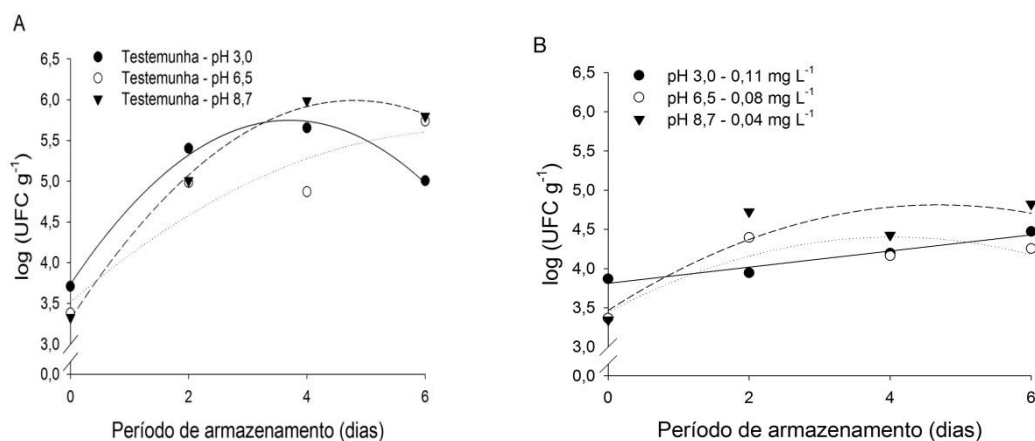


Figura 3 – Contagem de bolores e leveduras log (UFC g<sup>-1</sup>) (A) Morangos imersos por 5 minutos em água apenas com pH alterado (testemunhas) e armazenados a 5 °C. (B): Morangos imersos por 5 minutos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C.

Tabela 2 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à contagem de bolores e leveduras em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C

| Tratamento                        | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|-----------------------------------|--|----------------|
| Testemunha – pH 3,0               | $\hat{y} = 3,7353 + 1,0860X - 0,1465X^2$ | 0,99           |
| Testemunha – pH 6,5               | $\hat{y} = 3,5153 + 0,6249X - 0,0462X^2$ | 0,88           |
| Testemunha – pH 8,7               | $\hat{y} = 3,3037 + 1,1200X - 0,1167X^2$ | 0,99           |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> em pH 3,0 | $\hat{y} = 3,8119 + 0,1028X$             | 0,95           |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> em pH 6,5 | $\hat{y} = 3,4449 + 0,4735X - 0,0586X^2$ | 0,81           |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> em pH 8,7 | $\hat{y} = 3,4653 + 0,5751X - 0,0614X^2$ | 0,80           |

De acordo com os resultados obtidos, a água ozonizada com diferentes pH's, possibilitou incremento menos acentuado na contagem de bolores e leveduras nos frutos, ao longo do armazenamento. Quando se utilizou água ozonizada, com pH 6,5, obteve-se contagem estimada de 4,2 ciclos log, enquanto que para água não ozonizada, com mesmo pH, o valor estimado foi de 5,4 ciclos log, implicando em diferença de 1,2 ciclo log. Tendência semelhante foi observada para a água ozonizada com pH's equivalentes a 3,0 e 8,7. É importante ressaltar que a imersão em água ozonizada ou não foi capaz de reduzir a contagem de bolores e leveduras no início do armazenamento. Obteve-se contagem equivalente a 5,2 ciclos log nos morangos não tratados, enquanto

que naqueles imersos em água ozonizada ou não, as contagens permaneceram inferiores a 4,0 ciclos log.

*Salmonella* spp. e *E. coli* não foram detectadas nas amostras analisadas, independentemente do tratamento com água ozonizada e do período de armazenamento. Com relação à contagem de coliformes totais, apesar de presença em quantidade expressiva de amostras, os resultados obtidos não permitem inferir sobre a capacidade da água ozonizada de inativar esse grupo de microrganismos.

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em decorrência da interação tratamento e período de armazenamento para a variável percentual de perda de massa fresca. Porém, verificou-se diferença significativa ( $p < 0,01$ ) quando se analisaram os tratamentos e os períodos de armazenamento separadamente. Na Figura 4 tem-se a curva de regressão referente à perda de massa dos morangos em função do período de armazenamento, independentemente dos tratamentos. Decorridos seis dias de armazenamento, a perda de massa foi de aproximadamente 4,3%.

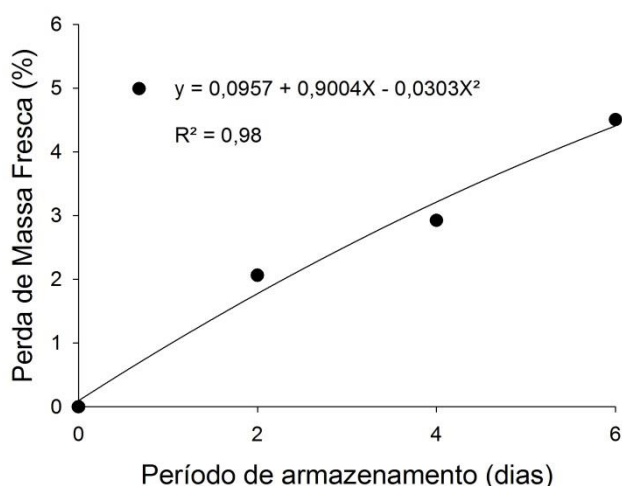


Figura 4 – Curva de regressão referente à perda de massa fresca (%) em morangos em função do período de armazenamento de morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C.

É possível observar na Tabela 3, valores médios da perda de massa fresca, em cada tratamento. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,01$ ), sendo que o percentual de perda de massa foi maior nos frutos não ozonizados – água com pH 3,0 e água com pH 8,7 – diferindo significativamente dos tratamentos com água ozonizada.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão referentes à perda de massa fresca de morangos imersos por 5 min em água ozonizada ou não em diferentes pH's, armazenados a 5 °C

| Tratamento                     | Perda de Massa Fresca (%) |
|--------------------------------|---------------------------|
| Testemunha pH 3,0              | 4,07 ± 2,45 a             |
| Testemunha pH 6,5              | 2,56 ± 2,17 ab            |
| Testemunha pH 8,7              | 3,48 ± 2,77 a             |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> pH 3,0 | 1,57 ± 1,43 b             |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> pH 6,5 | 1,22 ± 0,97 b             |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> pH 8,7 | 1,33 ± 1,15 b             |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação à variável pH não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento. Entretanto, para o período de armazenamento, houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ), quando analisado independentemente da exposição ou não à água ozonizada (Figura 5). Observou-se redução do pH ao longo do armazenamento, sendo que os valores obtidos permaneceram na faixa entre 3,2 e 3,5.

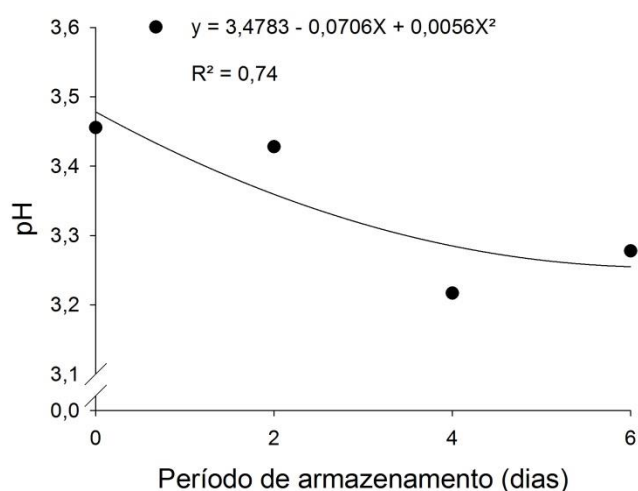


Figura 5 – Curva de regressão referente ao pH de morangos submetidos ou não à água ozonizada no período de armazenamento.

Obteve-se variação significativa em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento ( $p < 0,01$ ) para as variáveis teor de sólidos solúveis (SST),

acidez total titulável (ATT) e relação entre SST e ATT. Na Figura 6 são apresentadas as curvas de regressão referentes ao teor de sólidos solúveis totais de morangos que foram submetidos a 5 min de imersão em água ozonizada ou não em diferentes pH's. As equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes ao teor de sólidos solúveis em morangos imersos em água ozonizada e não ozonizada encontram-se na Tabela 4. Enquanto que nos frutos imersos na água ozonizada, com os diferentes pH's, os teores de sólidos solúveis totais variaram entre 6,4 e 7,2 °Brix, naqueles imersos em água não ozonizada com pH 3,0, o valor estimado foi de 4,75 °Brix.

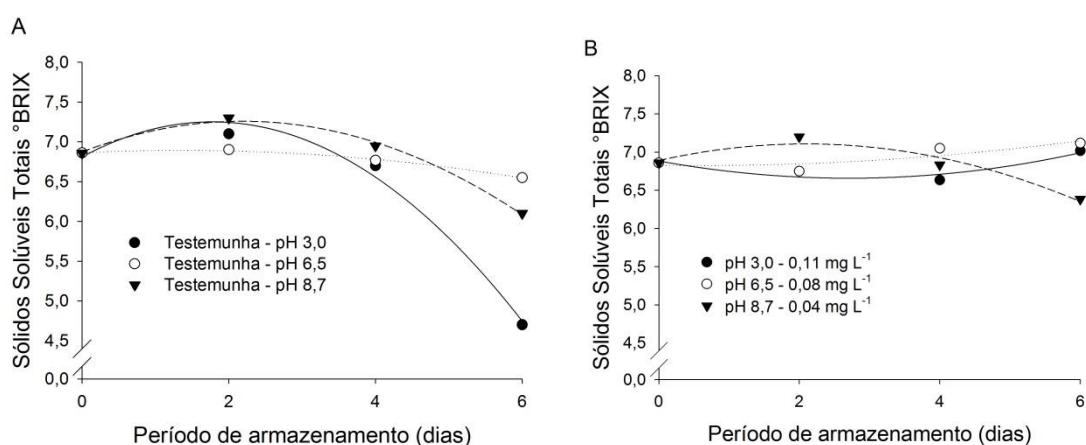


Figura 6 – Sólidos solúveis totais (°Brix) em (A) morangos imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C. (B) Morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C.

Tabela 4 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes ao teor de sólidos solúveis totais (°Brix) em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C

| Tratamento                        | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|-----------------------------------|--|----------------|
| Testemunha – pH 3,0               | $\hat{y} = 6,8104 + 0,4969X - 0,1401X^2$ | 0,99           |
| Testemunha – pH 6,5               | $\hat{y} = 6,8629 + 0,0440X - 0,0161X^2$ | 0,99           |
| Testemunha – pH 8,7               | $\hat{y} = 6,8729 + 0,3531X - 0,0807X^2$ | 0,56           |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> em pH 3,0 | $\hat{y} = 6,8838 - 0,1665X + 0,0307X^2$ | 0,84           |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> em pH 6,5 | $\hat{y} = 6,8262 - 0,0119X + 0,0109X^2$ | 0,76           |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> em pH 8,7 | $\hat{y} = 6,8896 + 0,2073X - 0,0495X^2$ | 0,94           |

Encontram-se na Figura 7 as curvas de acidez total titulável (% de ácido cítrico) em morangos imersos por 5 min em água ozonizada ou não com diferentes pH's e armazenados a 5 °C. Na Tabela 5 são apresentadas as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à acidez titulável em morangos imersos em água ozonizada e não ozonizada. Variações mais acentuadas foram verificadas nos frutos imersos em água não ozonizada. Destaca-se, entretanto, que os valores de acidez total titulável permaneceu superior a 0,80% em todos os tratamentos.

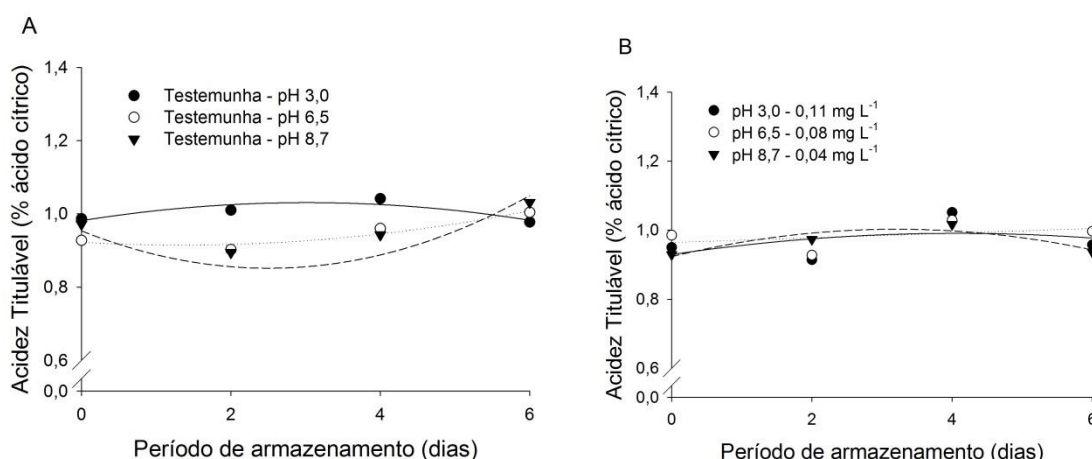


Figura 7 – Acidez Total Titulável (% de ácido cítrico) em morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C.

Tabela 5 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à acidez total titulável em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C

| Tratamento                        | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|-----------------------------------|--|----------------|
| Testemunha – pH 3,0               | $\hat{y} = 0,9814 + 0,0327X - 0,0054X^2$ | 0,78           |
| Testemunha – pH 6,5               | $\hat{y} = 0,9226 - 0,0116X + 0,0043X^2$ | 0,76           |
| Testemunha – pH 8,7               | $\hat{y} = 0,9536 - 0,0813X + 0,0162X^2$ | 0,76           |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> em pH 3,0 | $\hat{y} = 0,9294 + 0,0302X - 0,0037X^2$ | 0,21           |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> em pH 6,5 | $\hat{y} = 0,9642 + 0,0068X$             | 0,17           |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> em pH 8,7 | $\hat{y} = 0,9234 + 0,0495X - 0,0077X^2$ | 0,84           |

As curvas de regressão referentes à relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT) de morangos que foram submetidos a 5 min de imersão em água ozonizada ou não em diferentes pH's e armazenados a 5 °C são apresentadas na Figura

8. Encontram-se, na Tabela 6, as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à relação entre sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT) em morangos imersos em água ozonizada e não ozonizada. Tendência mais acentuada de redução de SST/ATT foi observada nos frutos imersos em água não ozonizada e com pH 3,0, com valores inferiores a 5,0 no sexto dia de armazenamento. Todavia, nos frutos imersos em água ozonizada, nos diferentes pH's, os valores de SST/ATT no sexto dia foram superiores a 6,7.

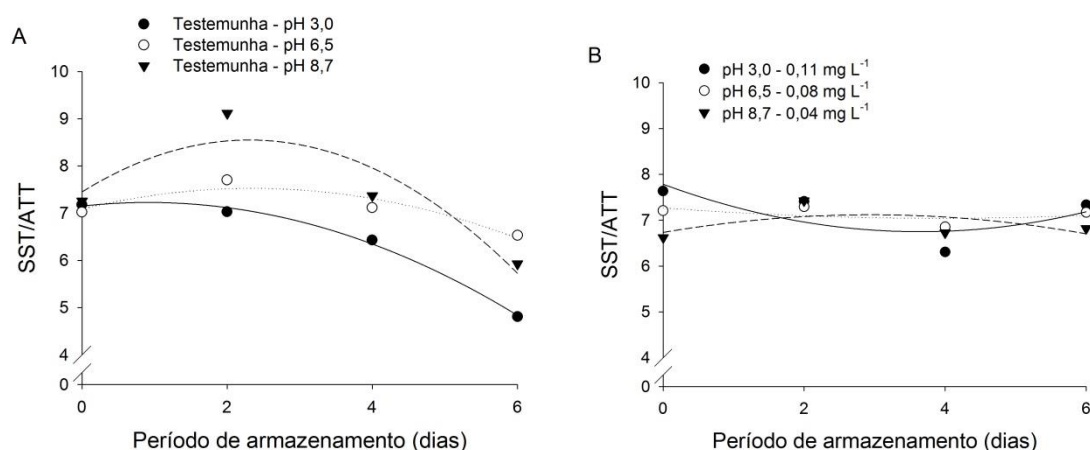


Figura 8 – Relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT) em morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada e armazenados a 5 °C.

Tabela 6 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à relação sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT) em morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C

| Tratamento                        | Equações de Regressão ajustadas          | $R^2$ |
|-----------------------------------|--|-------|
| Testemunha – pH 3,0               | $\hat{y} = 7,1511 + 0,1688X - 0,0924X^2$ | 0,99  |
| Testemunha – pH 6,5               | $\hat{y} = 7,0898 + 0,3730X - 0,0795X^2$ | 0,89  |
| Testemunha – pH 8,7               | $\hat{y} = 7,4504 + 0,9541X - 0,2068X^2$ | 0,85  |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> em pH 3,0 | $\hat{y} = 7,7861 - 0,5692X + 0,0781X^2$ | 0,57  |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> em pH 6,5 | $\hat{y} = 7,2707 - 0,1164X + 0,0148X^2$ | 0,26  |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> em pH 8,7 | $\hat{y} = 6,7334 + 0,2618X - 0,0445X^2$ | 0,32  |

Com relação à coloração da polpa dos frutos imersos em água ozonizada ou não, a saturação de cor variou significativamente ( $p < 0,01$ ), somente quando se analisou o efeito do período de armazenamento, independentemente dos tratamentos. Por outro

lado, a tonalidade e a diferença de cor variaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento.

Ocorreu decréscimo da saturação de cor da polpa dos frutos à medida que se elevou o período de armazenamento (Figura 9). Os valores referentes à saturação de cor variaram entre 36 e 39.

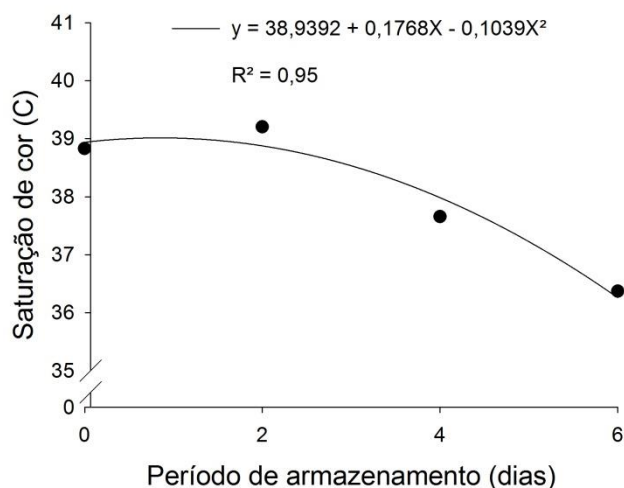


Figura 9 – Curva de regressão referente à saturação de cor (C) em polpa de morangos em função do período de armazenamento.

No que se refere à tonalidade ( $h^\circ$ ) (Figura 10) no sexto dia de armazenamento, enquanto nas polpas obtidas de frutos imersos em água não ozonizada com pH 3,0 e 8,7 os valores obtidos foram de 27,3 e 27,7, respectivamente, naquelas obtidas de frutos imersos em água ozonizada, os valores foram de aproximadamente 30,2. As equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à tonalidade de cor ( $h^\circ$ ) em morangos imersos em água ozonizada e não ozonizada estão na Tabela 7.



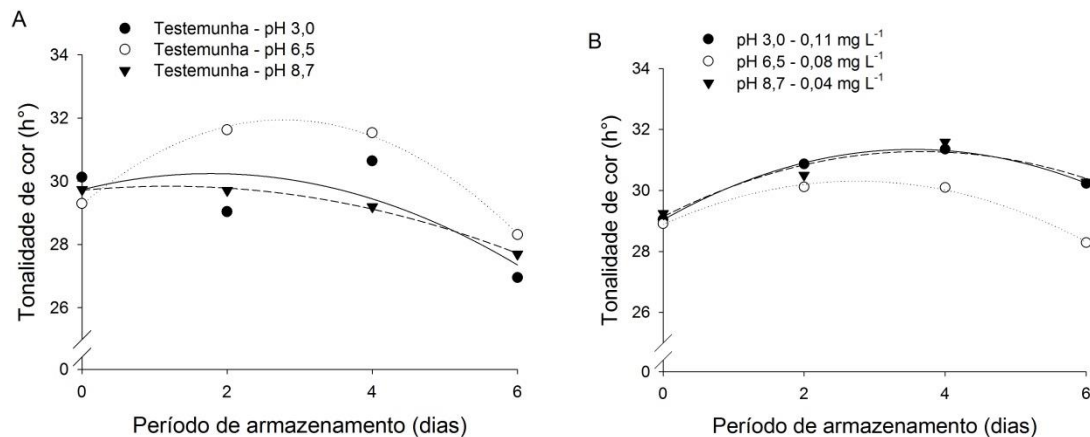


Figura 10 – Tonalidade de cor (h°) em polpa de morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C.

Tabela 7 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à tonalidade de cor (h°) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C

| Tratamento                        | Equações de Regressão ajustadas           | R <sup>2</sup> |
|-----------------------------------|---|----------------|
| Testemunha – pH 3,0               | $\hat{y} = 29,7322 + 0,5762X - 0,1621X^2$ | 0,60           |
| Testemunha – pH 6,5               | $\hat{y} = 29,2631 + 1,9288X - 0,3469X^2$ | 0,99           |
| Testemunha – pH 8,7               | $\hat{y} = 29,7139 + 0,2194X - 0,0919X^2$ | 0,99           |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> em pH 3,0 | $\hat{y} = 29,0348 + 1,3040X - 0,1839X^2$ | 0,99           |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> em pH 6,5 | $\hat{y} = 28,8827 + 1,0350X - 0,1881X^2$ | 0,99           |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> em pH 8,7 | $\hat{y} = 29,1388 + 1,1698X - 0,1601X^2$ | 0,91           |

Com relação à diferença de cor da polpa dos frutos (Figura 10), observou-se mesma tendência independentemente da ozonização, com elevação ao longo do armazenamento. Destaca-se que somente a polpa dos frutos imersos em água ozonizada com pH 8,7 apresentou diferença de cor inferior a 5,6 depois de seis dias de armazenamento. São apresentadas na Tabela 8 as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em morangos imersos em água ozonizada e não ozonizada.

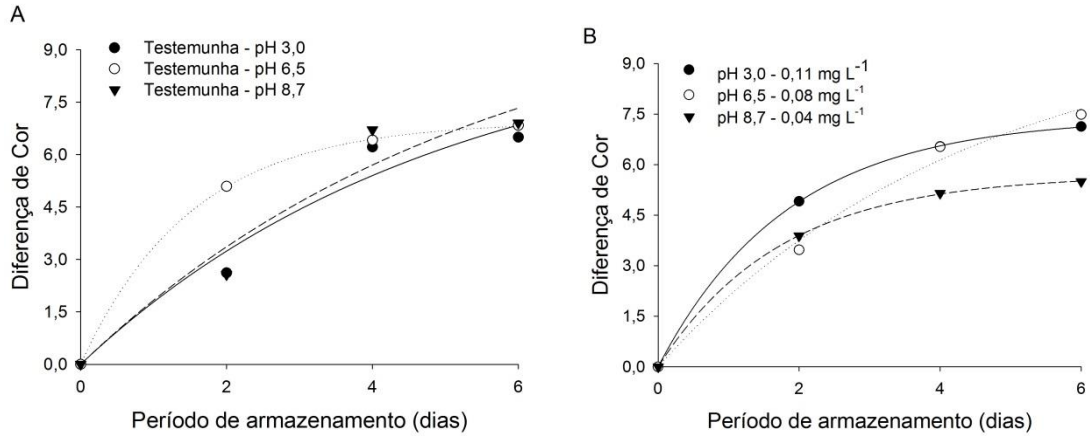


Figura 11 – Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos (A) imersos em água apenas com pH modificado (testemunhas) e armazenados a 5 °C; e, (B) morangos imersos em água ozonizada em diferentes pH's e armazenados a 5 °C.

Tabela 8 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada e armazenados a 5 °C

| Tratamento                        | Equações de Regressão ajustadas          | $R^2$ |
|-----------------------------------|--|-------|
| Testemunha – pH 3,0               | $\hat{y} = 9,7562 (1 - e^{(-0,2017X)})$  | 0,96  |
| Testemunha – pH 6,5               | $\hat{y} = 6,9465 (1 - e^{(-0,6572X)})$  | 0,99  |
| Testemunha – pH 8,7               | $\hat{y} = 11,0667 (1 - e^{(-0,1810X)})$ | 0,95  |
| 0,11 mg L <sup>-1</sup> em pH 3,0 | $\hat{y} = 7,3971 (1 - e^{(-0,5433X)})$  | 1,00  |
| 0,08 mg L <sup>-1</sup> em pH 6,5 | $\hat{y} = 10,2839 (1 - e^{(-0,2271X)})$ | 0,99  |
| 0,04 mg L <sup>-1</sup> em pH 8,7 | $\hat{y} = 5,6882 (1 - e^{(-0,5776X)})$  | 0,99  |

#### 4. DISCUSSÃO

Segundo Kim et al. (1999) a solubilidade do gás ozônio em meio aquoso dependerá também do conteúdo de matéria orgânica no meio, pois, quanto menor a concentração de matéria orgânica, maior será o tempo de meia vida do ozônio em água. Predominantemente processos de desinfecção ocorrem via ozônio molecular, já processos de oxidação podem ocorrer tanto por meio do ozônio molecular, em altas concentrações por via direta, como dos radicais hidroxila por via indireta (KIM et al., 2003; DI BERNADO e DANTAS, 2005; SILVA et al., 2011).

Em função da ausência de *Salmonella* spp. e *E. coli*, além da inexpressiva contagem de coliformes totais (Tabela 1), não foi possível avaliar o efeito da água ozonizada sobre esses grupos de microrganismos 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. e a tolerância máxima de coliformes a 45 °C é equivalente a  $2 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2001). Entretanto, há expressiva capacidade do ozônio de controlar o crescimento de aeróbios mesófilos e de bolores e leveduras nos morangos durante o armazenamento. A imersão em água ozonizada ocasionou diferença de 2,6 ciclos log quando se comparou os resultados obtidos nos frutos imersos em água ozonizada com pH 3,0 com aqueles nos frutos imersos em água não ozonizada com pH 6,5, ao final do armazenamento.

Encontram-se na literatura diversos trabalhos nos quais foi avaliada a eficácia do ozônio gasoso ou dissolvido na água no controle de microrganismos. Katzenelson et al. (1974) demonstraram que 0,06 µg/mL de ozônio em água com pH de 6,9 foi capaz de inativar 99% de *E. coli*, além da inativação do Polivírus type 1, causador da poliomielite em humanos, numa concentração de 0,03 µg/mL. Yoshizaki et al. (1988) observou que a água contendo ozônio foi capaz de causar a inativação do vírus do mosaico do tabaco (TMV). Khadre e Yousef (2001) demonstraram a capacidade de inativação de esporos da bactéria *Bacillus subtilis* ao se utilizar água contendo ozônio. Pang e Hung (2016) demonstraram que uma combinação de radiação UV e água ozonizada foi capaz de alcançar uma redução de 5 ciclos log na contagem de *E. coli* O157:H7 em alface romana e, semelhantemente, em alface iceberg, enquanto o tratamento somente com radiação UV obteve uma redução de 2,1 ciclos log, e, com solução de cloro, obteve-se uma redução de 2,5 ciclos log.

Smilanick et al. (1999) demonstraram através de um experimento com citros que dois minutos imersos em água contendo 1,5 ppm de ozônio em pH 6,4 foi capaz de matar entre 95-100% de esporos de agentes patogênicos fúngicos comuns na pós-colheita, tais como: *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus stolonifera*, *Botrytis cinerea* e *Geotrichum citriaurantii*; além disso, nenhum desses microrganismos sobreviveu 3 min em água contendo 1,5 ppm de ozônio. Martínez et al. (2002) demonstraram que ao utilizar água ozonizada na concentração de 2,2 mg L<sup>-1</sup> e por um período de imersão de 15 minutos em mangas, cultivar Haden, foi capaz de inibir significativamente a germinação de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e, em menor grau, *Lasiodiplodia theobromae*. Alencar et al. (2014) ozonizaram peras com gás ozônio na concentração de 100 ppm, por 60 minutos, e não observaram aumento significativo na contagem de bolores e leveduras por até 13 dias de armazenamento. Entretanto, os autores obtiveram contagem equivalente a 3,0 log UFC g<sup>-1</sup> nos frutos não submetidos à ozonização, depois de 13 dias de armazenamento.

Segundo Kim et al. (2003) alimentos que apresentam altos níveis de pH, levam à rápida decomposição do ozônio em meio aquoso e à formação de radicais hidroxila (OH). As alterações na eficiência do processo de desinfecção, quando há uma representativa variação no pH do meio, relacionam-se com mudanças na taxa de decomposição do ozônio. Tal processo pode justificar a menor eficácia no controle de aeróbios mesófilos quando se compara os resultados obtidos quando utiliza água ozonizada com pH's iguais a 3,0 e a 8,7 (Figura 2). Segundo Kim et al., (1998), a estabilidade do ozônio em água decresce quando o pH do meio aumenta; quando esse pH é superior a 8,0 praticamente metade do ozônio introduzido é decomposto em várias formas intermediárias de oxigênio, num período de 10 min (KIM et al., 2003; DI BERNADO e DANTAS, 2005; WYSOK et al., 2006).

No que se refere à qualidade físico-química, vários autores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Nadas e García (2003) constatou o efeito do ozônio em reduzir a perda de massa de morangos submetidos à atmosfera modificada em concentração de 1,5 µL L<sup>-1</sup> e estocados a 2 °C por três dias. Alexandre et al. (2012) utilizaram água ozonizada na concentração de 0,3 mg L<sup>-1</sup> para sanitização de morangos armazenados na temperatura de 4 °C por 14 dias e também observaram menor perda de massa nos frutos ozonizados.

É importante salientar a tendência observada na variável sólidos solúveis totais (Figura 6). A água ozonizada foi capaz de retardar o decréscimo no teor de sólidos solúveis totais nos morangos. Segundo Kader (1991), frutos de morango devem apresentar um mínimo de 7,0 °Brix de sólidos solúveis totais para terem um sabor aceitável, entretanto frutos maduros podem variar de 6 a 9 °Brix. O teor de sólidos solúveis nos dá um indicativo da quantidade de açúcares presente na fruta do morango, mas outros compostos, em menores proporções, também fazem parte da composição dos sólidos solúveis totais de uma fruta, que pode variar de acordo com o genótipo (KLUGE et al., 2002).

Em relação à variável acidez total titulável (Figura 7), os valores permaneceram superiores a 0,8%, que segundo Kader (1991), é o mínimo para caracterizar um sabor aceitável para o consumo dos morangos. Ainda de acordo com esse autor, os frutos de morango com sabor aceitável devem apresentar relação SST/ATT em torno de 7,5 e 8,75. A relação SST/ATT para os morangos tratados com água não ozonizada em diferentes pH's variou entre 4,8 e 6,5, enquanto que para os morangos tratados com água ozonizada permaneceu 6,7 e 7,2, próximos ao ideal na caracterização de um sabor aceitável.

A ozonização afetou a tonalidade de cor (Figura 10) e diferença de cor (Figura 11) da polpa dos morangos. Observou-se tendência de redução mais acentuada da tonalidade de cor na polpa dos frutos não ozonizados. Esse comportamento é esperado e pode ser explicado pela alteração na cor do produto que, à medida que se eleva o período de armazenamento, se torna mais avermelhado. Dessa forma, a ozonização foi capaz de retardar a redução da tonalidade nos frutos. Essas alterações estão associadas ao processo de amadurecimento, que continua a ocorrer durante o armazenamento (PONCE et al., 2010). Quando se analisou a variável diferença de cor, somente foi observada alteração expressiva na polpa dos frutos imersos em água ozonizada em pH 8,7, sendo observado alteração menos acentuada. Salienta-se que a variável diferença de cor foi obtida a partir dos valores de L, a e b, num 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 num distanciamento mais pronunciado da cor inicial. É importante mencionar a importância da adoção de métodos de conservação que amplie a vida de prateleira sem alterar as características e atributos relacionados à cor, pois são fatores limitantes para a aquisição de um produto *in natura* pelo consumidor.

## **5. CONCLUSÕES**

Concluiu-se, a partir dos resultados obtidos, que a utilização de água ozonizada em diferentes pH's pode ser considerada uma importante alternativa para a manutenção da qualidade pós-colheita de morango. Verificou-se que o pH influenciou a eficiência da água ozonizada no controle de microrganismos indesejáveis em morangos durante o armazenamento. Quanto à qualidade físico-química dos morangos, a água ozonizada foi capaz de retardar a perda de massa fresca, manter os níveis de pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, relação SST/ATT e das variáveis referentes à cor.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M. Petrifilm: Placas para contagem de *Escherichia coli*. **Instrução de uso**. 3M do Brasil Ltda. Microbiologia. St Paul, MN 55144-1000. 2016.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; PINTO, M. S.; COSTA, A. R.; CARVALHO, A. F. Effectiveness of Ozone on Postharvest Conservation of Pear (*Pyrus communis* L.). **Journal Food Processing & Technology**, v.5, p.317-321, 2014.

ALEXANDRE, E. M. C.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Efficacy of nonthermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. **Journal Food Engineering**, v.108, p.417-426, 2012.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 17<sup>a</sup> ed. Arlington: 2000p. 2002.

BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico Químicas para análise de alimentos**. Ministério da Saúde, p. 1018, 2005.

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, 10 jan. 2001, 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.

DI BERNADO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima, 2005. v. 2, 784 p.

FALCÃO, J. V. **Qualidade do solo e desempenho econômico do cultivo do morango em Brazlândia, Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 80 p. Dissertação de Mestrado. 2012.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agricultural commodities production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Acesso: 07 de novembro, 2015.

FERREIRA, V. L. P.; TEIXEIRA NETO, R. O.; MOURA, S. C. S. R.; SILVA, M. S. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, nº 1, p.37-42, 1999.

- FRANCIS, F.J. The origin of tan-1 a/b. **Journal of Food Science**, v. 40, p. 412, 1975.
- FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M., DESTRO, M. T. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu. p27-171. 2005.
- 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.** Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, v.21, p.96-130. 2013.
- GRAHAM, D. M, 1997. Use of ozone for food processing. **Food Technol.** 51(6):72-75.
- GÜZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, p.453-460, 2004.
- JACINTO, R. B. S.; NAVARRO, R. S.; ZÂNGARO, R. A.; ADRIANA, B. F.; LIMA, C. J. Utilização de ozônio para redução da carga microbiana em água de reuso. Instituto de Engenharia Biomédica, Unicastelo – São José dos Campos. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB**. 2014.
- JORDANO, R.; LOPEZ, C.; RODRIGUEZ, V.; CORDOBA, G.; MEDINA, L. M.; BARRIOS, J. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, Escherichia coli and yeasts and molds in foods. **Acta Microbiol Immunol Hung.** 42(3): 255-9. 1995.
- KADER, A. A. **Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberries**. In: DALE, A., LUBY, J. J. (eds.), The Strawberry into the 21st century. Portland: Timber Press, p. 145-152, 1991.
- KATZENELSON, E. B.; KLETTER, B.; SHUVAL, H. I. Inactivation kinetics of viruses and bacteria in water by use ozone. **J. Am. Water Works Assoc.** 66:725-729. 1974.
- KHADRE M. A, YOUSEF A. E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. **International Journal Food Microbiology**. (Forthcoming). 2001.
- KIM, J. G. **Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods**. Ph.D. thesis, The Ohio State University, Columbus, OH. 1998.
- 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, 1999.
- KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; KHADRE, M. A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research** Vol. 45. 2003.
- KLUGE, R. A. et al. Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado. **Livraria e Editora Rural**. 2 ed. Campinas. 214p. 2002.



- LAZAROVA, V.; SAVOYE, P.; JANEX, M. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. **Water Science Technology**, London, v. 40, n. 4-5, p. 201-213, 1999.
- LITTLE, A. Off on a tangent. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, p.410-411, 1975.
- MARTÍNEZ, C. B.; GARCÍA, L. P. L.; SÁNCHEZ, J. S. Efects of ozone, Iodine and Chlorine on Spore Germination of Fungi Isolated from Mango Fruits. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. **Revista Mexicana de Fitopatología**. 2002.
- 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.
- 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.
- PANG, Y. H.; HUNG, Y. C. Efficacy of Slightly Acidic Electrolyzed Water and UV-Ozonated Water Combination for Inactivating Escherichia Coli O157:H7 on Romaine and Iceberg Lettuce during Spray Washing Process. **Journal of Food Science**, 81: M1743–M1748. 2016.
- 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.
- PRESTES, E. B. **Avaliação da eficiência do ozônio como sanitizante em hortaliças folhosas minimamente processadas**. 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.
- SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. Valéria Christina Amstalden - São Paulo : Livraria Varela. p31. 1997.
- SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Ciências Agrárias, Ciências de Alimentos**. v.32, p.659-682, 2011.
- SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Ciências Agrárias, Ciências de Alimentos**. v.32, p.659-682, 2011.
- SMILANICK, J.L.; CRISOSTO, C.; MLIKOTA, F. Postharvest use of ozone on fresh fruit. **Perishables Handling Quarterly Issue**, n° 99. 1999.

SOPHER, C. D.; GRAHAM, D. M.; RICE, R. G.; STRASSER, J.H. Studies on the Use of Ozone in Production Agriculture and Food Processing. **Proceedings of the International Ozone Association**. Pan American Group, p.15. 2002.

WYSOK, B.; URADZIŃSKI, J.; GOMÓKA-PAWLICHKA, M. Ozone as an alternative disinfectant – A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.15, p.3-8, 2006.

YOSHIZAKI T.; MIURA K.; UEDA T. Mechanism of inactivation of tobacco mosaic virus with ozone. **Water Res.** 22 (7): 933-938. 1988.

## **CAPÍTULO II**

**EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO  
CONTROLE DE MICRORGANISMOS E NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE  
MORANGO ARMAZENADO**

# EFEITO DA ÁGUA OZONIZADA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NO CONTROLE DE MICRORGANISMOS E NA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE MORANGO ARMAZENADO

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da água ozonizada em diferentes condições sobre microrganismos na pós-colheita de morango, além de avaliar possíveis efeitos na qualidade físico-química durante o armazenamento. Utilizaram-se morangos da variedade "Portola", sem a utilização de agroquímicos na produção. Os morangos foram divididos em três lotes: gás ozônio dissolvido em água na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> e borbulhado por 40 min, gás ozônio dissolvido em água na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> e, por fim, o último lote não foi submetido à imersão em água ozonizada. Em seguida os morangos foram armazenados em câmara fria a 5 °C. As análises dos frutos foram realizadas no dia da ozonização (tempo zero) e a cada três dias até o dia nove de armazenamento. Na etapa microbiológica foi avaliada a presença de *Salmonella* spp., coliformes totais, *E. coli*, bolores e leveduras e aeróbios mesófilos, todos expressos em log (UFC g<sup>-1</sup>). As variáveis qualitativas avaliadas foram: perda de massa fresca, pH, acidez total titulável, teor de sólidos solúveis, relação SST/ATT e coloração. Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial 3x4, sendo três tratamentos e quatro períodos de armazenamento (0, 3, 6 e 9), com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância e posteriormente análise de regressão. A água ozonizada foi eficiente no controle de microrganismos, principalmente no que se refere a aeróbios mesófilos. Em relação à qualidade físico-química dos morangos armazenados, a água ozonizada não afetou expressivamente a perda de massa fresca, pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, relação SST/ATT e variáveis referentes à cor. Concluiu-se que a utilização de água ozonizada pode tornar-se um método promissor no controle de microrganismos e na manutenção da qualidade físico-química de morangos armazenados.

**Palavras-chave:** Ozônio; Microrganismos patogênicos; Microrganismos deteriorantes; Alterações qualitativas.

# EFFECT OF OZONIZED WATER IN DIFFERENT CONCENTRATIONS ON THE CONTROL OF MICROORGANISMS AND THE PHYSICAL-CHEMICAL QUALITY OF STRAWBERRY STORED

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of ozonated water on different conditions on microorganisms in strawberry post-harvest, besides evaluating possible effects on the physical-chemical quality during storage. Strawberries of the "Portola" variety were used, without the use of agrochemicals in the production. The strawberries were divided into three lots: ozone gas dissolved in water at a concentration of  $45 \text{ mg L}^{-1}$  and bubbled for 40 min, ozone gas dissolved in water at a concentration of  $20 \text{ mg L}^{-1}$ , and finally the last batch was not submitted to immersion in ozonated water. The strawberries were then stored in a cold room at  $5^\circ \text{C}$ . The fruits were analyzed on the day of ozonation (zero time) and every three days until day nine of storage. In the microbiological stage, the presence of *Salmonella* spp., Total coliforms, *E. coli*, molds and yeasts and aerobic mesophiles, all expressed in  $\log(\text{UFC g}^{-1})$ , were evaluated. The qualitative variables evaluated were: fresh weight loss, pH, total titratable acidity, soluble solids content, ratio and staining. A completely randomized design was used in a  $3 \times 4$  factorial scheme, with three treatments and four storage periods (0, 3, 6 and 9), with three replications. Initially, analysis of variance and regression analysis were performed. The ozonated water was efficient in the control of microorganisms, especially with regard to aerobic mesophiles. Regarding the physico-chemical quality of the stored strawberries, the ozonated water did not significantly affect the loss of fresh mass, pH, total soluble solids, total titratable acidity, ratio and color variables. It was concluded that the use of ozonated water can become a promising method in the control of microorganisms and in the maintenance of the physical-chemical quality of stored strawberries.

**Keywords:** *Ozone; Pathogenic microorganisms; Deteriorating microorganisms; Qualitative changes.*

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro começou a desenvolver-se economicamente no Brasil no final da década de 1950, em Minas Gerais, onde foi se adaptando a diversos climas e solos. Chegou ao Distrito Federal na década de 1960, através de produtores de origem japonesa vindos de São Paulo; obtiveram relativo sucesso devido à altitude da região, cerca de 1.000 m acima do nível do mar, e condições climáticas favoráveis, temperaturas mais altas no verão e inverno ameno e seco (MORETTI, 2008; HENZ, 2010). Atualmente a olericultura é uma das principais atividades agrícolas e econômicas para pequenos produtores no Distrito Federal, cuja área cultivada é de aproximadamente 6.500 hectares/ano. O morango é uma das principais culturas no contexto social e econômico do Distrito Federal, pois é uma olerícola que possui um alto valor agregado e geração de empregos na região. Atualmente a produção de morango no DF é de aproximadamente 6,5 mil toneladas (EMATER-DF, 2011; FALCÃO, 2012).

O morango é consumido predominantemente *in natura*, mas uma considerável quantidade é utilizada na indústria. Dessa forma, deve-se garantir adequado manejo durante o cultivo, colheita, transporte e armazenamento, com intuito de reduzir perdas e alcançar melhor aceitação pelo consumidor (ZAMBOLIM e COSTA 2005; SEERAM et al, 2006; CALVETE et al, 2008; HENZ et al., 2008). Os frutos de morango também se destacam por possuírem fontes de compostos bioativos, tais como: vitamina C, folato e compostos fenólicos; outras vitaminas também são encontradas: tiamina, riboflavina, niacina, vitamina K, vitamina B6, Vitamina A e Vitamina E. Dentre esses fatores o morango é considerado atraente por tais características sensoriais e por sua composição nutricional (FRANCO, 2002; PROTEGGENTE et al., 2002; HENRIQUES et al., 2004; GIAMPIERI et al., 2012).

O consumo *in natura* de morango orgânico está comprometido pela suscetibilidade dos frutos à contaminação microbiológica. As más práticas de manejo do cultivo, manipulação dos frutos sem um devido controle, o uso de matéria orgânica sem os devidos processos de compostagem entre outros fatores, tem permitido a contaminação dos frutos de morango por patógenos que, ao serem consumidos, podem causar infecções e danos à saúde humana, além de perdas no armazenamento das características qualitativas (BOLLEN, 1985; OSHITA, 2012). 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).

Há uma grande importância nas etapas da cadeia produtiva do morango, em que os frutos devem ser conservadas as propriedades físico-químicas, tais como pH, acidez total titulável, coloração e sólidos solúveis, além de controlado e/ou inibido o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, que comprometem a sanidade do produto. 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). Diante desses fatos é necessária a adoção de métodos que sejam eficientes na redução de microrganismos, tanto patogênicos como deteriorantes, de tal forma a garantir a segurança do produto e, conseqüentemente, reduzir a velocidade do processo de deterioração. É possível uma redução de até 90% da carga microbiana, adotando-se lavagem com água corrente, porém não é suficiente para tornar o alimento seguro. Em função disso, é fundamental a etapa de sanificação, com a utilização de agentes que sejam eficientes na inativação dos microrganismos (BEUCHAT et al., 1998). Dentre as propriedades desejadas para um sanificante, Lelieveld et al. (2003) destacam que: devem possuir largo espectro antimicrobiano; ser de fácil uso; não possuir propriedades tóxicas e irritantes; ser de baixo custo.

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 (KIM et al., 1999). O gás ozônio surge como uma alternativa à utilização de produtos clorados na indústria de alimentos, pois os compostos clorados possuem algumas desvantagens no tratamento de água e na indústria de alimentos, tais como a formação de compostos mutagênicos e carcinogênicos na água e/ou superfície de contato dos alimentos (LAZAROVA et al., 1999). Salienta-se que o ozônio foi classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) nos Estados Unidos e liberado como agente antimicrobiano pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso em alimentos, tanto na forma gasosa quanto dissolvido em água (FDA, 2001). Dentre os compostos encontrados na natureza, o gás ozônio se destaca por apresentar o segundo maior potencial de oxidação (2,07 mV) (GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; NOVAK e YUAN, 2007). Essa característica torna o ozônio um forte agente antimicrobiano com grande aplicabilidade na indústria de alimentos e um dos mais potentes sanitizantes conhecidos, além de uma alternativa à utilização de produtos clorados na indústria, pois, além de não gerar resíduos, se decompõe no próprio oxigênio.

Vale ressaltar que o efeito do ozônio já é conhecido sobre diversos grupos de microrganismos, tais como fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Botrytis* e *Mucor* (RAILA et al., 2006; WU et al., 2006; ZOTTI et al., 2008; ALENCAR et al., 2013), além do vírus, e bactérias (KIM et al., 1999; KHADRE et al., 2001; OSKAN et al., 2011; ALEXOPOULOS et al., 2013). Entretanto a utilização de água ozonizada na sanitização de frutas e hortaliças ainda é menos evidenciada quando comparado às aplicações do ozônio na forma de gás. Kim et al. (2003) e Di Bernado e Dantas (2005) relatam que a ozonização da água vai depender de diversos fatores, tais como: cinética de decomposição em meio aquoso, teor de matéria orgânica na água, temperatura da água e o pH do meio. A utilização de água ozonizada no processo de pós-colheita de morango, assim como de outras frutas e hortaliças, são muitas, que incluem tratamentos para controlar infecções de patógenos e propágulos, saneamento de água em sistemas de lavagem, tanques de descarga, saneamento das superfícies de equipamentos além de embalagens.

Diante de tudo que foi exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito sanitizante do ozônio dissolvido em água para o controle de microrganismos em morango e avaliar possíveis alterações na qualidade físico-química durante o armazenamento.



## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Vegetais, Laboratório de Análises de Leite e Derivados e Laboratório de Análise de Alimentos, localizados na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília.

### **2.1 Origem e tratamento prévio das amostras**

Os morangos da variedade "Portola" foram adquiridos diretamente de um produtor da região administrativa de Brazlândia – Distrito Federal, no dia 06 de dezembro de 2016. Na produção desses morangos não foi utilizada qualquer forma de agroquímico para o controle de pragas e doenças, entretanto, esses morangos não são considerados orgânicos, pois o produtor faz uso de adubação química, porém é uma adubação equilibrada e sem o uso de adubação nitrogenada, que torna um sistema de “Produção Sustentável”. Os morangos foram colhidos pela manhã no estágio de maturação comercial e transportados à tarde para o Laboratório de Pré-Processamento e Armazenamento de Produtos Vegetais, colocados sobre refrigeração a 5° C, por um período de aproximadamente 12 horas. Todas as etapas do experimento foram realizadas pela manhã, os morangos foram devidamente selecionados, frutos com lesões e/ou ferimentos foram descartados, para ozonização utilizou-se somente os frutos sadios, uniformes e sem defeito.

### **2.2 Geração do gás ozônio**

O gás ozônio foi obtido por meio de um gerador de ozônio (Modelo O&L 5.0 RM) baseado no método de Descarga por Barreira Dielétrica (DBD) – efeito corona. 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 (Figura 1). 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 gás ozônio (O<sub>3</sub>).

No processo de geração do ozônio, foi utilizado como insumo oxigênio (O<sub>2</sub>) com grau de pureza de aproximadamente 90%, isento de umidade, obtido de concentrador de oxigênio acoplado ao gerador de ozônio.



Figura 1 – Gerador de ozônio Modelo O&L 3.0-O2 RM. Fonte: Arquivo pessoal.

### **2.3 Obtenção da água ozonizada**

Foi utilizado duas concentrações de ozônio, uma de 45 mg L<sup>-1</sup> e vazão de 1 L min<sup>-1</sup> e outra concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> e vazão de 1 L min<sup>-1</sup>; para a primeira concentração de ozônio o tempo de borbulhamento em água foi de 40 min, enquanto que na segunda concentração o tempo de borbulhamento foi de 20 min. Para ozonização utilizou-se 3,0 L d'água, dividido em dois recipientes de 1,5 L cada, esse processo foi repetido para cada um dos tratamentos.

### **2.4 Quantificação do ozônio dissolvido na água**

A quantificação do ozônio dissolvido na água foi realizada em fotômetro SAM CHEMetrics, Modelo I-2019, com faixa de medição de 0,01 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

### **2.5 Tratamento dos morangos com água ozonizada**

Os frutos, devidamente selecionados, foram divididos em três lotes. O experimento consistiu de cinco tratamentos, sendo duas diferentes concentrações de gás ozônio na água e dois tempos de contato da água ozonizada com os morangos (tempo de

imersão), além da testemunha do experimento, que não passou por nenhum processo de sanitização. Os tratamentos foram identificados da seguinte forma:

- C1 – concentração de ozônio de  $45 \text{ mg L}^{-1}$ , com tempo de borbulhamento da água de 40 minutos;
- C2 – a concentração de ozônio de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  com tempo de borbulhamento da água de 20 minutos;
- Testemunhas – Não recebeu nenhum tratamento.

As concentrações do ozônio equivalentes a  $45 \text{ mg L}^{-1}$  (40 min) e  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (20 min) acarretaram concentrações de ozônio dissolvido na água equivalentes a  $3,43 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,90 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente. Inicialmente os frutos foram acondicionados em recipiente de vidro com capacidade de 3,0 L e imersos em água por 7,5 min. Finalizado esse período, efetuou-se a drenagem da água. Em seguida, os frutos foram acondicionados em embalagens de polietileno retangulares (18 cm x 12 cm), transparentes e identificados de acordo com cada tratamento, com 3 repetições. Em cada uma das embalagens foram colocados aproximadamente 100 g de morango. Armazenaram-se em câmara climática tipo B.O.D. na temperatura de  $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas imediatamente depois da imersão dos frutos na água ozonizada e água não ozonizada e a cada três dias até o dia 9 de armazenamento (0, 3, 6 e 9 dias de armazenamento).

## **2.6 Análises microbiológicas dos morangos**

### **2.6.1 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 destas análises microbiológicas. A solução com água peptonada correspondeu à diluição de  $10^{-1}$  e a partir desta diluição foram feitas as diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , em solução salina 0,85% (NaCl).

Para contagem de bolores e leveduras (YM), aeróbios mesófilos (AC) e coliformes totais e *Escherichia coli* (EC) utilizou-se o sistema Petrifilm<sup>TM</sup> (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA), conforme orientação do fabricante. Destaca-se que essa técnica foi testada em morango fresco por Jordano et al. (1995) para esses microrganismos, sendo obtido resultado satisfatório. Para a contagem *Salmonella* spp.,

utilizou-se o protocolo descrito pela Instrução Normativa número 62, do Ministério da Agricultura. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama (UFC g<sup>-1</sup>).

## **2.6.2 Detecção de microrganismos utilizando o sistema Petrifilm™**

### **2.6.2.1 Contagem de Coliformes totais e *E. coli* (Petrifilm™ EC 6404)**

Para contagem de Coliformes totais e fecais utilizou-se a diluição de 10<sup>-1</sup>, e o Método Oficial AOAC® 991.14, descrito para alimentos, com incubação de 24h ± 2h para coliformes totais a 35°C ± 1°C (AOAC, 2002). Para contagem de *E. coli*, as condições de incubação foram 35 ± 1 °C por 48 ± 2h. Os resultados obtidos foram expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC g<sup>-1</sup>), posteriormente em log UFC g<sup>-1</sup>.

### **2.6.2.2 Contagem de Aeróbios Mesófilos (Petrifilm™ AC)**

Na contagem de Aeróbios Mesófilos utilizou-se o sistema Petrifilm™ AC, nas diluições de 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>. A incubação das placas seguiu o Método Oficial AOAC® 990.12 – Contagem de Aeróbios em Placas de Alimentos, Filme Reidratável Seco, com incubação por 48h ± 3h a 35°C ± 1°C (AOAC, 2002).

### **2.6.2.3 Contagem de Bolores e Leveduras (Petrifilm™ YM)**

Para contagem de Bolores e Leveduras utilizou-se o sistema Petrifilm™ YM, nas diluições de 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>. A incubação das placas seguiu o Método Oficial AOAC® 997.02 – Contagem de Bolores e Leveduras em Alimentos, com incubação de 5 dias a 20°C – 25°C (AOAC, 2002). Os resultados obtidos foram expressos em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC g<sup>-1</sup>), posteriormente em log UFC g<sup>-1</sup>.

### **2.6.2.4 *Salmonella* spp.**

A partir da diluição de 10<sup>-1</sup> foram transferidos 1 mL para tubos com 10 mL de caldo selenito cistina (Fluka Analytical) e 0,1 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Acumedia), os quais foram incubados a 42 ± 0,2 °C, durante 24 horas, para o enriquecimento seletivo. A etapa seguinte foi o plaqueamento diferencial,

em placas contendo Agar Salmonella Shigella (Acumedia) que foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 24 horas para confirmar a presença de *Salmonella* spp. As placas com colônias suspeitas *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 na IN N<sup>o</sup>.62/2003 (BRASIL, 2003). Os critérios microbiológicos adotados foram os contidos na RDC 12/2001 (BRASIL, 2001).

## **2.7 Avaliação da qualidade físico-química dos morangos**

### **2.7.1 Perda de Massa Fresca (PMF)**

A perda de massa fresca foi estimada, em porcentagem (%), pela diferença da massa registrada no momento no início do experimento (dia zero) e os diferentes dias de armazenamento (2, 4 e 6 dias). A perda de massa foi calculada utilizando-se a Equação 1:

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{M_i - M_f}{M_i} 100 \quad \text{Equação 1.}$$

### **2.7.2 Potencial Hidrogênionico (pH)**

O pH foi determinado com o potenciômetro Digimed Mod. DM21. Utilizou-se aproximadamente 10 gramas de amostra triturada e homogeneizada em 100 mL de água destilada.

### **2.7.3 Acidez Total Titulável**

A análise de acidez titulável foi determinada conforme a normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2008). Utilizou-se aproximadamente 10 gramas de amostra triturada e homogeneizada em 100 mL de água destilada. Efetuou-se a titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N padronizada até o ponto de viragem equivalente a pH 8,2, utilizando-se potenciômetro Digimed Mod. DM21. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

#### 2.7.4 Sólidos Solúveis Totais (SST)

Os sólidos solúveis totais foram determinados no refratômetro digital Atago (Modelo 1T). Os resultados foram expressos em °Brix, segundo AOAC (2002).

#### 2.7.5 Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT)

A partir dos valores obtidos referentes a Sólidos Solúveis Totais e Acidez Titulável foi possível a obtenção da relação SST/ATT, definida como *Ratio*.

#### 2.7.6 Coloração dos Morangos

A cor do morango foi avaliada usando o 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. Foram obtidos os valores de um sistema de coordenadas Lab Hunter que define a cor em termos de L, a e b – luminosidade (L); a = verde (-) x vermelho (+); b= azul (-) x amarelo (+) (FERREIRA et al., 1999).

Com os valores das coordenadas L, a e b foi possível obter parâmetros relacionados à saturação da cor ou croma (C), Equação 2, à tonalidade (h), Equação 3, e diferença de cor ( $\Delta E$ ), Equação 4 (LITTLE, 1975, FRANCIS, 1975, MCLELLAN et al., 1995, MASKAN, 2001).

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

$$h = \arctang (b/a) \quad (3).$$

$$\Delta E = \sqrt{[(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2]} \quad (4).$$

Em que:

h = tonalidade da cor;

C = saturação da cor ou croma;

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 os valores obtidos no tempo zero.

## **2.8 Delineamento Experimental**

Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado em Esquema Fatorial 3x4, sendo três tratamentos e quatro períodos de armazenamento (0, 3, 6 e 9 dias), com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância e posteriormente análise de regressão. Para análise de variância utilizou-se o programa ASSISTAT 7.7 e o software SigmaPlot v. 10 para a obtenção das equações e plotagem dos gráficos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação da eficiência da água ozonizada no controle de microrganismos em morangos armazenados

Em função da ausência de *Salmonella* spp. de *E. coli* e da inexpressiva contagem de coliformes totais, não foi possível avaliar o efeito da água ozonizada sobre esses grupos de microrganismos nos morangos armazenados. 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. e a tolerância máxima de coliformes a 45 °C é equivalente a  $2 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2001).

Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) para contagem de aeróbios mesófilos em decorrência da interação tratamento e período de armazenamento de morangos. Na Figura 2 encontram-se os valores referentes à contagem de aeróbios mesófilos log (UFC g<sup>-1</sup>) em morangos imersos em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. Na Tabela 1 encontram-se as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de aeróbios mesófilos em função do período de armazenamento.

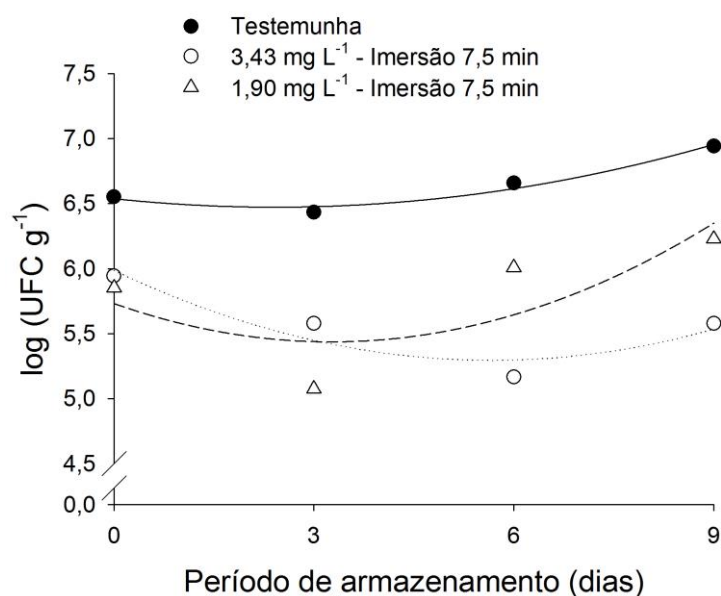


Figura 2 – Contagem de aeróbios mesófilos log (UFC g<sup>-1</sup>) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.



Tabela 1 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à contagem de aeróbios mesófilos em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamento                                | Equações de Regressão ajustadas    | R <sup>2</sup> |
|---|------------------------------------|----------------|
| Testemunha                                | $y = 6,5379 - 0,0539X + 0,0111X^2$ | 0,97           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $y = 5,9867 - 0,2439X + 0,0215X^2$ | 0,98           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $y = 5,7319 - 0,1808X + 0,0277X^2$ | 0,61           |

Os frutos não ozonizados permaneceram com contagem de aeróbios mesófilos elevada e superior aos dois tratamentos ao longo de todo período de armazenamento, obtendo-se contagem final estimada equivalente a 7,0 ciclos log. O tratamento com água ozonizada na concentração de 3,43 mg L<sup>-1</sup> e tempo de imersão de 7,5 min, apresentou contagem inferior aos demais tratamentos ao final do período de armazenamento. Nessa condição, a contagem de aeróbios mesófilos foi equivalente a 5,5 ciclos log, o que implica em diferença 1,5 ciclos log, quando se comparou com o resultado obtido nos frutos não ozonizados.

Tais resultados podem ser explicados pelo elevado poder oxidativo do ozônio (KIM et al., 1999). Outros autores também verificaram o elevado potencial do ozônio de inativar microrganismo. Rodgers et al. (2004) compararam a eficácia do ozônio, soluções de cloro e ácido peroxiacético em maçãs, morangos, melão e alface contaminados com *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes*. Segundo esses autores a maior redução na população desses microrganismos utilizando-se ozônio. Aguayo et al. (2013) relataram que a água ozonizada, na concentração de 0,4 mg L<sup>-1</sup>, e três tempos de imersão: 1, 3 e 5 min, é eficaz na redução da carga de bactérias mesófilas em frutos de tomate. Nesse trabalho, foi observado que no 5° e 14° dia de armazenamento o tempo de imersão de 3 min foi mais eficiente que 1 e 5 min. Beltrán et al. (2005) avaliaram o uso de água ozonizada em alface e obtiveram redução na contagem de aeróbios mesófilos 1,8 ciclos log quando comparada com o resultado obtido no produto não ozonizado, depois de 13 dias de armazenamento a 4 °C.

Obteve-se diferença significativa (p<0,01) em decorrência da interação tratamento e período de armazenamento para contagem de bolores e leveduras em morangos imersos em água ozonizada ou não. Na Figura 3 encontram-se as curvas de regressão referentes à contagem de bolores e leveduras em morangos submetidos a dois tempos de imersão em água em duas diferentes concentrações de ozônio. Na Tabela 2

encontram-se as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à contagem de bolores em morangos ozonizados ou não em função do período de armazenamento.

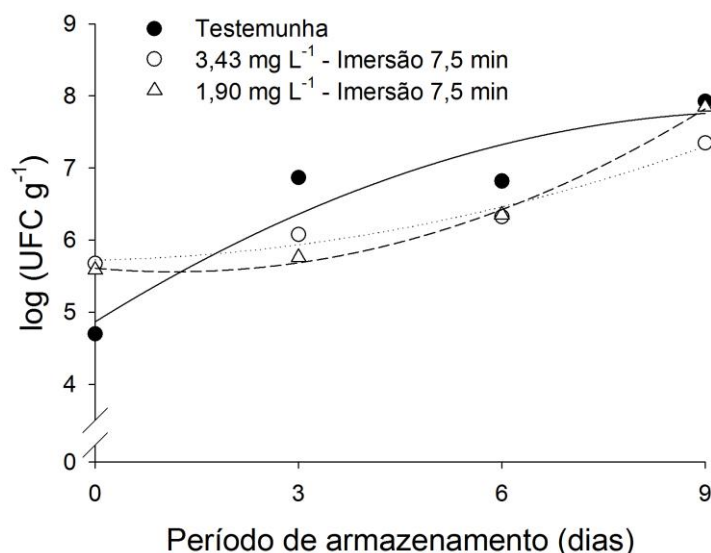


Figura 3 – Contagem de bolores e leveduras log (UFC g<sup>-1</sup>) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 2 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à contagem de bolores e leveduras em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|---|--|----------------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = 4,8673 + 0,5860X - 0,0294X^2$ | 0,90           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 5,7238 + 0,0184X + 0,0174X^2$ | 0,97           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 5,6112 - 0,0962X + 0,0368X^2$ | 0,99           |

Observou-se expressivo incremento na contagem de bolores e leveduras em todos os tratamentos, ao longo do período de armazenamento (Figura 3). Destaca-se, entretanto, a diferença observada quando se comparam os resultados obtidos nos frutos não ozonizados com aqueles imersos em água ozonizada na concentração de 3,43 mg L<sup>-1</sup> com tempo de imersão de 7,5 min. Nos frutos não ozonizados, a contagem de bolores e leveduras foi de 7,8 ciclos log, enquanto que o valor obtido para a concentração de 3,43 mg L<sup>-1</sup> foi de 7,3 ciclos log.

A água ozonizada tem sido testada no controle de bolores e leveduras em produtos de origem vegetal. Martínez et al. (2002) demonstraram que água ozonizada na concentração de  $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ , associada a período de imersão de 15 min, é capaz de inibir significativamente a germinação de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e, em menor grau, *Lasiodiplodia theobromae* em manga. Alexopoulos et al. (2013) avaliaram a eficiência de ozônio dissolvido na água no controle de bolores e leveduras em alface e obtiveram redução de 2,14 ciclos log, quando se adotou a concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , por período de exposição de 30 min. Aguayo et al. (2013) obtiveram, para contagem de leveduras, redução em torno de 1,0 ciclo log em tomate, adotando-se concentração do ozônio dissolvido na água de  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ , por 3 e 5 min.

### **3.2 Variáveis qualitativas dos morangos armazenados**

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em decorrência da interação tratamento e período de armazenamento para as variáveis percentual de perda de massa, pH, sólidos solúveis totais e relação entre sólidos solúveis totais e acidez total titulável (SST/ATT). Verificou-se diferença significativa no tratamento ( $p < 0,01$ ) e diferença significativa no período de armazenamento ( $p < 0,01$ ), independentemente da exposição ou não a água ozonizada, para a variável acidez total titulável. Na Figura 7 tem-se a curva de regressão no período de armazenamento para a variável acidez total titulável.

Na Figura 4 encontram-se os valores referentes à perda de massa (%) em morangos submetidos a dois tempos de imersão em água ozonizada em duas diferentes concentrações. Na Tabela 3 encontram-se as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à perda de massa fresca em morangos em função do período de armazenamento.

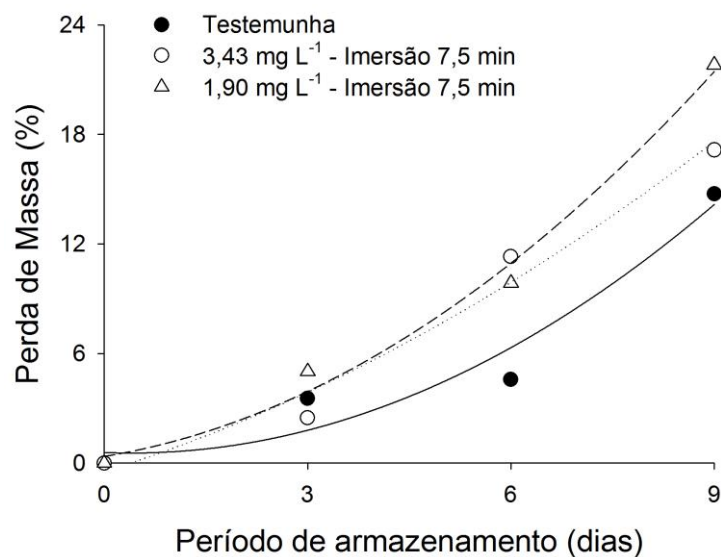


Figura 4 – Perda de Massa (%) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 3 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à perda de massa (%) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas           | R <sup>2</sup> |
|---|---|----------------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = 0,5825 - 0,1473X + 0,1840X^2$  | 0,94           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = -0,4681 + 1,1688X + 0,0934X^2$ | 0,98           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 0,3655 + 0,6073X + 0,1927X^2$  | 0,99           |

Em geral, observou-se maior perda de massa nos frutos imersos em água ozonizada. Os tempos de imersão adotados podem ter influenciado a perda de massa dos frutos, uma vez que o morango se destaca por ter tecido delicado. A maior perda de massa nos frutos pode está associado a possíveis danos ocasionados pelo ozônio, que possui um alto poder oxidativo. Ao se elevar a concentração do ozônio ou o período de exposição, podem-se acarretar danos no produto (KIM et al., 2003; GÜZEL-SEYDIM et al., 2004; NOVAK e YUAN, 2007; MAHMOUND e FREIRE, 2007). Apesar de obter tais resultados no presente trabalho é importante destacar que há diversos trabalhos na literatura em que o ozônio, tanto na forma gasosa quanto dissolvido na água, é capaz de reduzir o percentual de perda de massa de frutas e hortaliças ao longo do armazenamento. Zhang et al. (2011) observaram uma diminuição significativa na perda de massa de morangos ao longo de 20 dias de armazenamento ao se utilizar uma

concentração de gás ozônio de 4 ppm. Liu et al. (2016) observaram que, ao utilizarem água ozonizada, na concentração de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  e tempo de contato de 5 e 10 minutos, houve uma redução da perda de massa de maçãs frescas depois dois dias de armazenamento. Por outro lado, Spencer (2003) ao aplicar ozônio em duas cultivares de batata, Norland e Russet Burbank, observou que a perda de massa mínima foi nas batatas não ozonizadas. No produto ozonizado, o autor verificou que quanto maior a concentração maior a perda de massa durante o armazenamento.

Em relação à variável pH (Figura 5 e Tabela 4), apesar de se obter diferença significativa entre os tratamentos, observou-se que os valores de pH permaneceram entre 3,1 e 3,4. No que tange à variável Sólidos Solúveis Totais (Figura 6 e Tabela 5), observou-se redução ao longo do armazenamento nos frutos imersos em água ozonizada na concentração de  $1,90 \text{ mg L}^{-1}$ . Todavia, houve expressivo aumento do teor de sólidos solúveis totais nos frutos expostos ao ozônio na concentração de  $3,43 \text{ mg L}^{-1}$ , por 7,5 min. Os frutos de morango devem apresentar um mínimo de  $7,0^\circ\text{Brix}$  de sólidos solúveis totais para terem um sabor aceitável, porém os frutos maduros podem variar de 6 a  $9^\circ\text{Brix}$  (KADER, 1991).

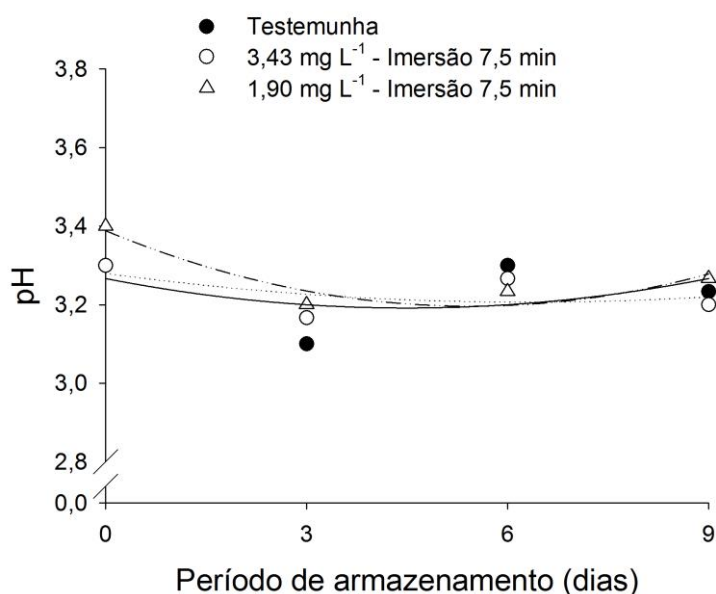


Figura 5 – pH de morangos submetidos a dois tempos de imersão em água ozonizada em duas diferentes concentrações e armazenados a  $5^\circ\text{C}$ .

Tabela 4 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes ao pH de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|---|--|----------------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = 3,2667 - 0,0333X + 0,0037X^2$ | 0,17           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 3,2800 - 0,0233X + 0,0019X^2$ | 0,28           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 3,3883 - 0,0706X + 0,0065X^2$ | 0,88           |

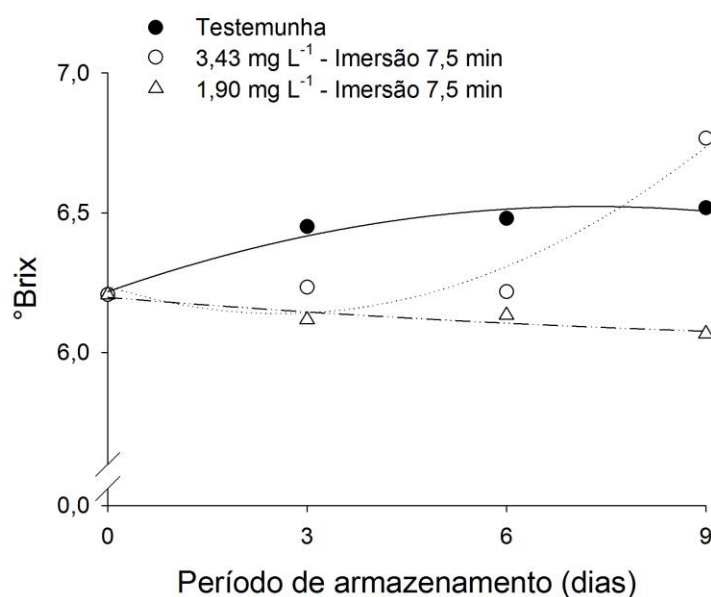


Figura 6 – Teor de Sólidos Solúveis Totais (°Brix) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 5 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes ao teor de Sólidos Solúveis Totais (°Brix) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|---|--|----------------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = 6,2177 + 0,0837X - 0,0057X^2$ | 0,96           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 6,2372 - 0,0754X + 0,0145X^2$ | 0,92           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 6,1972 - 0,0193X + 0,0006X^2$ | 0,82           |

Na Figura 7 é apresentada a curva de regressão na qual se relaciona acidez total titulável e período de armazenamento. Observou-se incremento da acidez total titulável depois do nono dia de armazenamento, com valores superiores a 1,0%. No que tange o

efeito dos tratamentos na acidez total titulável (Tabela 6), independentemente do período de armazenamento, em geral a ozonização não afetou a qualidade dos morangos. Ressalta-se que é esperado que morangos com qualidade satisfatória apresentem acidez total titulável mínima de 0,80% (KADER, 1991).

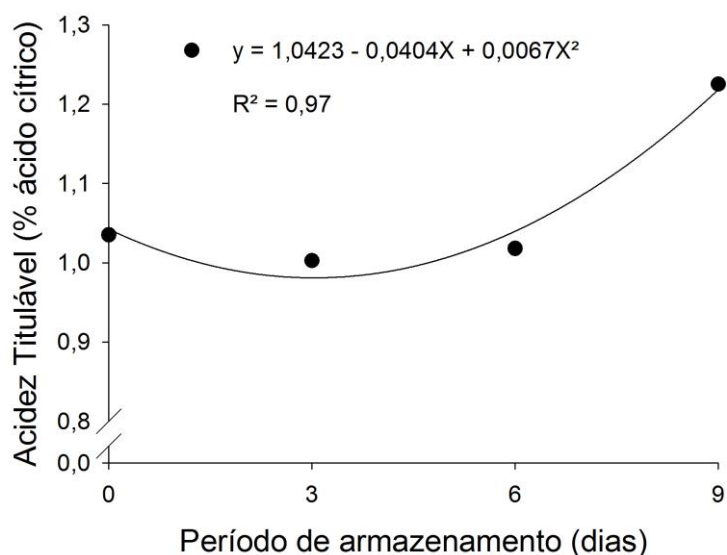


Figura 7 – Curva de regressão referente à acidez total titulável (% ácido cítrico) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão referentes à acidez titulável de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                     | Acidez Titulável (% ácido cítrico) |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Testemunha                      | 1,10 ± 0,14 a                      |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> 7,5 min | 1,10 ± 0,10 a                      |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> 7,5 min | 1,02 ± 0,07 a                      |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 8 são apresentadas as curvas de regressão da relação entre Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C. Na Tabela 7 encontram-se as equações das regressões ajustadas e respectivos coeficientes de determinação referentes à relação SST/ATT em morangos imersos em água ozonizada ou não em diferentes combinações e armazenados a 5 °C. Verificou-se decréscimo na relação SST/ATT ao final do armazenamento, sendo que essa tendência foi mais acentuada nos

frutos que não foram imersos em água ozonizada. Estimou-se em 5,14 a relação SST/ATT nos frutos não ozonizados.

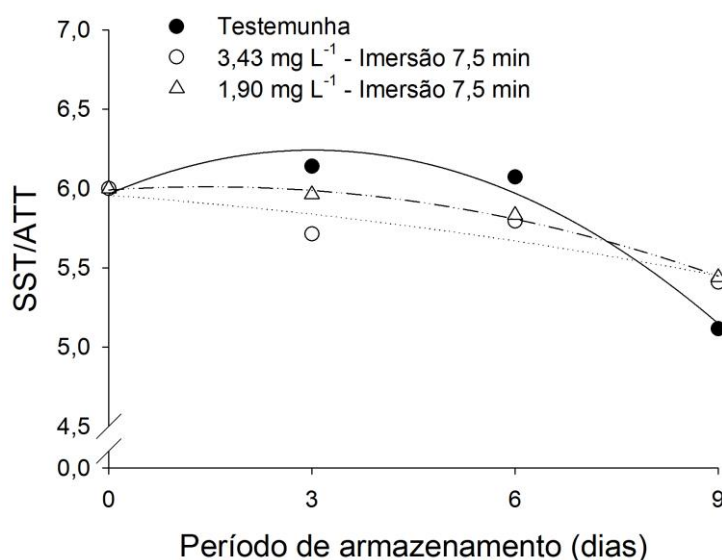


Figura 8 – Relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável (SST/ATT) em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 7 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à relação Sólidos Solúveis Totais e Acidez Total Titulável em morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas          | R <sup>2</sup> |
|---|--|----------------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = 5,9650 + 0,1839X - 0,0305X^2$ | 0,97           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 5,9572 - 0,0315X - 0,0028X^2$ | 0,81           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 5,9907 + 0,0285X - 0,0099X^2$ | 0,99           |

No que se refere à coloração da polpa dos frutos, obteve-se diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em decorrência da interação entre tratamento e período de armazenamento para as variáveis saturação (Figura 9 e Tabela 8), tonalidade (Figura 10 e Tabela 9) e diferença de cor (Figura 11 e Tabela 10). Verificou-se redução da saturação de cor na polpa dos frutos em todos os tratamentos, não sendo possível associar tal comportamento à imersão em água ozonizada. Nadas e García (2003) obtiveram valores de saturação e tonalidade de cor inferiores em morangos tratados com ozônio na concentração de 1,5  $\mu\text{L L}^{-1}$  e estocados a 2 °C, em comparação com frutos não ozonizados. Barth et al. (1995) encontraram valor de tonalidade de cor ( $h^\circ$ ) significativamente menor em amoras tratadas com ozônio depois de 5 dias de



armazenamento a 2 °C. Quando se analisaram os resultados de diferença de cor da polpa dos frutos, observou-se aumento em todos os tratamentos ao longo do armazenamento, sendo a tendência mais acentuada nas polpas dos frutos imersos em água ozonizada na concentração de 1,90 com tempo de imersão de 7,5.

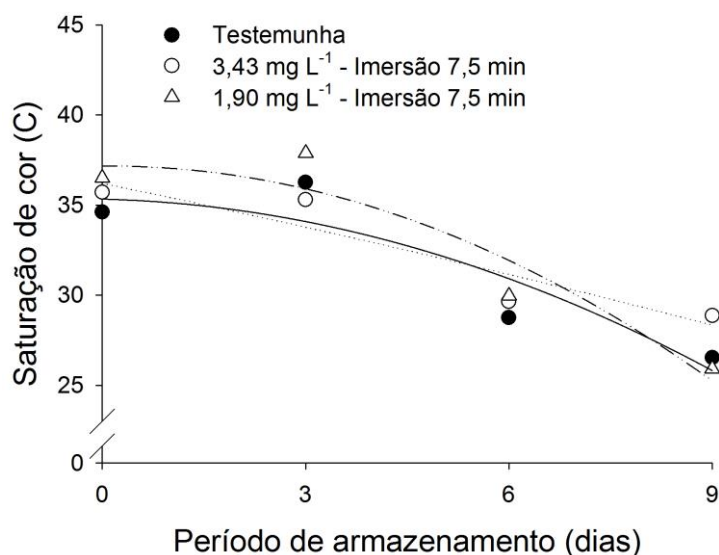


Figura 9 – Saturação de cor (C) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 8 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à Saturação de cor (C) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas           | R <sup>2</sup> |
|---|---|----------------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = 35,3329 - 0,0934X - 0,1070X^2$ | 0,84           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 36,2129 - 0,7816X - 0,0102X^2$ | 0,87           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 37,1658 + 0,0316X - 0,1506X^2$ | 0,91           |

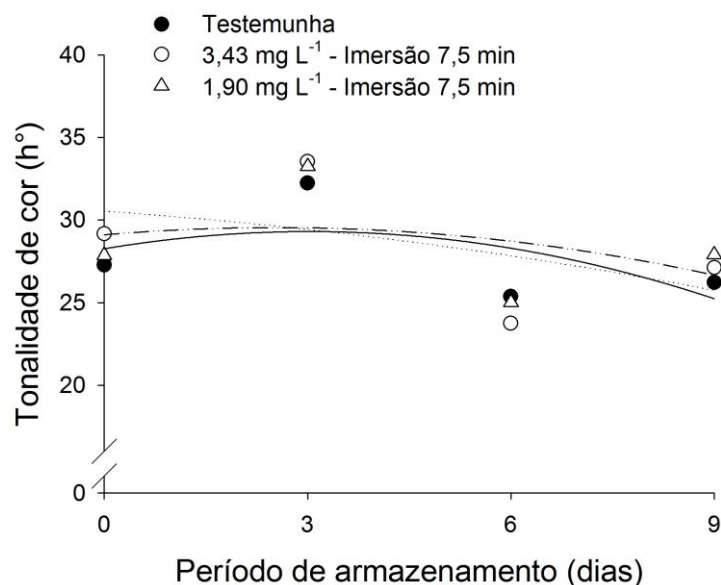


Figura 10 – Tonalidade de cor (h°) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 9 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>) referentes à Tonalidade de cor (h°) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas           | R <sup>2</sup> |
|---|---|----------------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = 28,2636 + 0,6890X - 0,1138X^2$ | 0,33           |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 30,5447 - 0,2884X - 0,0272X^2$ | 0,26           |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 29,1086 + 0,3479X - 0,0688X^2$ | 0,14           |

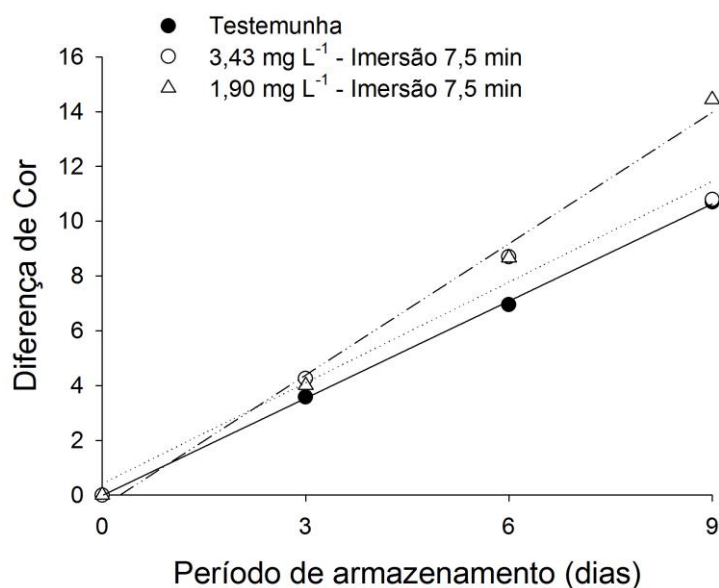


Figura 11 – Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C.

Tabela 10 – Equações de regressão ajustadas e respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) referentes à Diferença de Cor ( $\Delta E$ ) em polpa de morangos imersos ou não em água ozonizada em diferentes condições e armazenados a 5 °C

| Tratamentos                               | Equações de Regressão ajustadas | $R^2$ |
|---|---------------------------------|-------|
| Testemunha                                | $\hat{y} = -0,0157 + 1,1829X$   | 0,99  |
| 3,43 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = 0,4154 + 1,2268X$    | 0,98  |
| 1,90 mg L <sup>-1</sup> – Imersão 7,5 min | $\hat{y} = -0,4192 + 1,5991X$   | 0,99  |

#### **4. CONCLUSÃO**

Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos, que a utilização de água ozonizada é uma importante alternativa para a conservação de morangos armazenados nas condições adotadas no trabalho. Em geral, a água ozonizada foi capaz de reduzir a contagem de microrganismos, principalmente no que se refere a aeróbios mesófilos. Em relação à qualidade físico-química dos morangos armazenados, a água ozonizada, nas condições adotadas, não afeta expressivamente a perda de massa fresca, pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, relação SST/ATT e variáveis referentes à cor.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, E.; ESCALONA, V.; SILVEIRA, A. C.; ARTÉS, F. Quality of tomato slices disinfected with ozonated water. **Food Science and Technology International**. 20(3) 227–235. 2013.

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.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L.R.D.; PINTO, M.S.; COSTA, A.R. Postharvest quality of ozonized nanica cv. Bananas. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, p. 107-114, 2013.

ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; CECIU, S.; LAZAR, V.; MANTZOURANI, I.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLOU, E.. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annum*). **Food Control**, v.30, p.491-496, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 2002.

BARTH M.M.; ZHOU C.; MERCIER, J.; PAYNE, F. A. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. **Journal of Food Science** 60:1286–8. 1995.

BELTRÁN, D.; SELMA, M. V.; MARÍN, A.; GIL, M. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. 53: 5654–5663. 2005.

BEUCHAT, L.R.; NAIL, B.V.; ADLER, B.B.; CLAVERO, M.R. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1305-11. 1998.

BOLLEN, G.J. The fate of plant pathogens during composting of crop residues. In: GASSER, J.K.R. (Ed.). **Composting of agricultural and other wastes**. London: Elsevier Applied Science. 1985.

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, 10 jan. 2001, Seção I, p. 45-53. 2001.

CALVETE, E.O.; MARIANI, F.; WESP, C.L.; NIENOW, A.A.; CASTILHOS, T.; CECCHETTI, D.. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.396-401. 2008.

DI BERNADO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. Rimav. 2, 784 p. 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: 27 de Novembro. 2016.

FALCÃO, J. V. **Qualidade do solo e desempenho econômico do cultivo do morango em Brazlândia, Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 80 p. Dissertação de Mestrado. 2012.

FDA (Food and Drug Administration). Revised, 2013. **Direct Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1563>>. Acesso em: 11 de janeiro. 2016.

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

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.

GÜZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.37, p.453-460, 2004.

HENRIQUES, A.T.; BASSANI, V.L.; RASEIRA, M. do C.; ZUANAZZI, J.A. **Antocianos e capacidade antioxidante de frutas**. In: Simpósio Nacional do Morango Embrapa Clima Temperado. p.271-282. 2004.

HENZ G. P.; REIS A; SILVA KCC; PEREIRA SF. Incidência de Doenças de Pós-Colheita em Frutos de Morango Produzidos no Distrito Federal. **Brasília: Embrapa Hortaliças**. 13p. 2008.

HENZ, G. P. Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 260-265, 2010.

JORDANO, R.; LOPEZ, C.; RODRIGUEZ, V.; CORDOBA, G.; MEDINA, L. M.; BARRIOS, J. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, Escherichia coli and yeasts and molds in foods. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 42(3): 255-9. 1995.

KADER, A. A. **Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberries**. In: DALE, A., LUBY, J. J. (eds.), *The Strawberry into the 21st century*. Portland: Timber Press, p. 145-152. 1991.

- 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.; KHADRE, M. A. Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in Food and Nutrition Research**. Vol. 45. 2003.
- 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, 1999.
- LAZAROVA, V.; SAVOYE, P.; JANEX, M. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives. **Water Science Technology**, 40, n. 4-5, p. 201-213, 1999.
- LELIEVELD, H.L.M.; MOSTERT, M.A.; HOLAH, J.; WHITE, B. **Hygiene in food processing**. 421p., 2003.
- LIU, C.; MA, T.; HU, W.; TIAN, M.; SUN, L. Effects of aqueous ozone treatments on microbial load reduction and shelf life extension of fresh-cut apple. **International Journal of Food Science and Technology**, 51, 1099–1109. 2016.
- MAHMOUND, A.; FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, pp.198-205. 2007.
- MORETTI, C. L. **Manuseio pós-colheita, compostos funcionais e logística de distribuição de morangos**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 4.; ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3. 2008
- 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.
- 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. 2007.
- OSHITA, D.; JARDIM, S.F.C.I. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna, **Scientia Chromatographica**. v.4, n.1, p. 52-76, 2012.

OSKAN, R.; SMILANICK, J.L.; KARABULUT, O.A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.60, p.47-51, 2011.

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.

RAILA, A.; LUGAUSKAS, A.; STEPONAVIČIUS, D.; RAILIENĖ, M.; STEPONAVIČIENĖ, A.; ZVICEVIČIUS, E. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.13, n.2, p.287-294, 2006.

RODGERS, S. L.; CASH, J. N.; SIDDIQ, M.; RYSER, E. T. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries and cantaloupe. **J. Food Prot.** 67(4), 721-731. 2004.

SEERAM, N.P.; LEE, R.; SCHEULLER, H.S.; HEBER, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatographic analysis of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 97, p.1–11. 2006.

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.

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.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. Manejo integrado de doenças do morangueiro. In: CARVALHO, S. P. (Coord.). **Boletim do morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico.** CEASA Minas, 2005. p. 55-96. 2005.

ZHANG, X.; ZHANG, Z.; WANG, L.; ZHANG, Z.; LI, L.; ZHAO, C. Impact of ozone on quality of strawberry during cold storage. **Front. Agric. China**, 5(3): 356-360. 2005.

ZOTTI, M.; PORRO, R.; VIZZINI, A.; MARIOTTI, M.G. Inactivation of *Aspergillus* spp. by ozone treatment. **Ozone-Science & Engineering**, v.30, n.6; p.423-430, 2008.