

(S1-P54)

**ESTUDO DO EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO COM OZONO  
AQUOSO E AGENTES QUÍMICOS NA SEGURANÇA DE MORANGO  
(FRAGARIA ANANASSA)**

**ELISABETE M.C. ALEXANDRE, DORA M. SANTOS-PEDRO, TERESA R. S.  
BRANDÃO, CRISTINA L.M. SILVA\***

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa  
Rua Dr. António Bernardino de Almeida  
4200-072 Porto, Portugal  
Telefone: + 351 225 580 058  
Fax: + 351 225 090 351  
\*E-mail: [clsilva@esb.ucp.pt](mailto:clsilva@esb.ucp.pt)

**Palavras-chave:** frutos e vegetais – segurança – ozono - peróxido de hidrógeno - hipoclorito de sódio

**RESUMO**

O desenvolvimento de tecnologias inovadoras que promovam a segurança de frutos e vegetais, reduzindo o risco de doenças associadas a produtos contaminados, constitui uma preocupação actual. Os tratamentos térmicos, quando convenientemente aplicados, são eficientes na redução da carga microbiana dos frutos e vegetais. Contudo, a temperatura tem um impacto bastante negativo ao nível da textura dos alimentos. Como alternativa podem ser utilizados diversos agentes químicos na lavagem dos hortofrutícolas, tais como soluções de peróxido de hidrogénio e de cloro, de forma a garantir a sua segurança e maior retenção de qualidade. Mais recentemente, a utilização de ozono como agente desinfectante, quer em fase aquosa, quer em fase gasosa, tem vindo a ser objecto de estudo.

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito do ozono em solução aquosa, na redução de mesófilos totais em morango. Os resultados foram comparados com os obtidos por lavagens utilizando dois agentes químicos: soluções de peróxido de hidrogénio (1% e 5% m/m) e soluções de hipoclorito de sódio disponível na forma comercial de Amukina (11.5 g/L). Todos os tratamentos aplicados tiveram a duração de 2 minutos.

Os tratamentos com ozono foram combinados com tratamentos térmicos (branqueamentos a 50 ou 55 °C, durante 1 minuto).

Os resultados mostraram que o tratamento não térmico mais eficaz na redução da flora mesófila, foi a lavagem com peróxido de hidrogénio a 5% (redução de cerca de 2 ciclos logarítmicos). Estes resultados não são significativamente diferentes dos resultados obtidos com lavagens com água ozonada (resultados confirmados por ANOVA e testes Post Hoc). O efeito dos tratamentos térmicos, a 50 e 55 °C, não foi potenciado quando estes foram combinados com lavagens com ozono. Resultados semelhantes foram obtidos quando os tratamentos combinados foram aplicados por ordem alternada (*i.e.* branqueamento vs ozono ou ozono vs branqueamento).

## STUDY OF THE EFFECT OF OZONE IN AQUEOUS SOLUTION AND CHEMICAL AGENTS ON STRAWBERRY'S SAFETY (*FRAGARIA ANANNASSA*)

**Keywords:** fruits and vegetables – safety – ozone - hydrogen peroxide - sodium hypochlorite

### ABSTRACT

The development of innovative technologies, aiming at reducing the risk of related food-borne diseases and thus promoting fruits and vegetables, is an actual concern. Thermal treatments, when conveniently applied, are efficient in microbial load reduction. However, temperature has a negative impact at food textural level. Alternatively, washings with solutions of several chemical agents, such as hydrogen peroxide or sodium hypochlorite, may be applied. More recently, the use of ozone as a disinfectant agent, both in aqueous or in gaseous phases, has been considered.

The objective of this work was to study the effect of ozone in aqueous solution, on total mesophyles reduction in strawberries. Results were compared to the ones obtained with washings with two chemical agents: hydrogen peroxide solutions (1% and 5% w/w) and sodium hypochlorite solutions, commercially available as Amukina (11.5 g/L). All treatments were applied for 2 minutes.

Ozone treatments were also combined with thermal processes (blanching at 50 or 55 °C, for 1 minute).

Results showed that washings with hydrogen peroxide solutions at 5% were the most efficient non-thermal treatments applied for mesophyles reduction in strawberries (approximately 2 log-cycles). These results were not significantly different from the ones obtained with ozonated-water washings (confirmed by ANOVA and Post Hoc tests). The thermal treatment effect, at 50 and 55 °C, was not enhanced when combined with ozonated-water washings. Similar results were obtained when the combined treatments were applied by alternated order (*i.e.* blanching vs ozono ou ozono vs blanching).

### INTRODUÇÃO

Os consumidores têm vindo a alterar os seus hábitos alimentares, verificando-se um aumento de preferência por produtos hortofrutícolas frescos e minimamente processados. Desta forma, a ocorrência de doenças associadas a produtos frescos contaminados representa um sério problema de saúde pública. Durante as etapas de processamento de frutos e vegetais "prontos para consumo" (*ready-to-eat*), tais como a picagem e o corte, ocorre um aumento significativo da população microbiana, conduzindo a uma redução do seu tempo de prateleira.

Os tratamentos térmicos, quando convenientemente aplicados, são eficazes na redução da carga microbiana dos frutos e vegetais. Contudo, a temperatura tem um impacto bastante significativo ao nível das características sensoriais dos produtos (a textura é um dos atributos mais afectados negativamente; Philippon e Rouet-Mayer, 2003). Como alternativa mais tradicional podem ser utilizados diversos agentes químicos na lavagem dos hortofrutícolas, tais como soluções de cloro e de peróxido de hidrogénio, de forma a garantir a sua segurança e maior retenção de qualidade. A eficácia destes tratamentos está directamente relacionada com a sensibilidade de cada microrganismo ao agente desinfectante utilizado, encontrando-se publicados um grande número de trabalhos com resultados muito variáveis.

O cloro pode ser adicionado a águas de lavagem de alimentos na forma de hipoclorito de cálcio ou de sódio. A concentração de cloro habitualmente utilizada na desinfecção de

produtos frescos encontra-se na gama 50 - 200 p.p.m.. Ukuku e Sapers (2001) referem uma redução de 3 ciclos logarítmicos de *Salmonella* numa determinada variedade de melão (*Cucumis melo*), quando lavado com uma solução de cloro. No caso da microflora endógena superficial e de *E. coli.*, uma lavagem semelhante conduziu a reduções de 2 e 3-4 ciclos logarítmicos, respectivamente (Ukuku et al., 2001).

Soluções de peróxido de hidrogénio são também vulgarmente utilizadas na desinfecção de hortofrutícolas. Ukuku et al. (2005) estudaram o efeito deste agente em duas variedades de melão inoculado com *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Estes autores obtiveram diferentes reduções para amostras cortadas ou inteiras, ao longo de um determinado período de tempo. Sapers et al. (1999) observaram uma redução 2.5 ciclos logarítmicos de *E. coli* em amostras de maçã lavadas com soluções de peróxido de hidrogénio.

Mais recentemente o ozono, quer em fase gasosa, quer em fase aquosa, tem vindo a ser utilizado como uma tecnologia inovadora de processamento alimentar, que garante a qualidade dos produtos sob o ponto de vista microbiológico, aumentando o tempo de prateleira dos frutos e vegetais (Rice et al., 1982). O ozono é um oxidante potente, que não deixa resíduos tóxicos quando comparado com agentes de desinfecção mais tradicionais (Kim et al., 2003; Dufresne et al., 2004). Processos com ozono têm vindo a ser referidos como eficazes ao nível da qualidade e segurança alimentar (Khadre et al., 2001; Guzel-Seydim et al., 2004; Manousaridis et al., 2005). Contudo, os resultados publicados sobre o efeito do ozono em solução aquosa não são promissores. Ketteringham et al. (2006) observaram apenas uma redução de 0.72 ciclos logarítmicos de mesófilos totais em amostras de pimento verde. Estas reduções foram demasiado baixas para tornar o processo economicamente viável.

O objectivo deste trabalho consistiu no estudo do efeito do ozono (em solução aquosa) na redução de *mesófilos totais* em amostras de morango. Lavagens com soluções de dois agentes químicos (hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogénio) foram também realizadas, para comparação dos resultados com procedimentos tradicionais.

Complementarmente, estudou-se o efeito da combinação do tratamento de ozonização com tratamentos térmicos mais suave (branqueamentos a 50 e a 55 °C).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Os morangos (*Fragaria anannassa*) foram adquiridos num mercado local, e foram cortados em pedaços e submetidos aos tratamentos em estudo. Antes e após tratamentos foi quantificado o teor de mesófilos totais nas amostras.

### Tratamentos aplicados

**Lavagens com soluções de agentes químicos.** Amostras de morango foram lavadas em soluções de hipoclorito de sódio (11,5 g/L, disponível na forma comercial de “Amukina”) e de peróxido de hidrogénio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1% e 5% m/m). A razão entre a quantidade de amostra e o volume de solução desinfectante foi de 20 g/L. O tempo de tratamento foi de 2 minutos (pelo menos 4 réplicas).

**Tratamentos com ozono.** Os tratamentos em ozono foram realizados num equipamento piloto de produção contínua de ozono (O<sub>3</sub>). Um gerador de ozono (OZ5, SPO3, Sociedade Portuguesa de Ozono, Portugal) foi interconectado a um tanque de água (a 15 °C; volume de 30 L; razão entre a quantidade de amostra e o volume de água ozonada foi de 20 g/30L). O ozono foi incorporado na água continuamente, sendo a sua concentração medida indirectamente por diferença de potencial (SZ 265, B&C Electronics). A concentração de ozono foi de aproximadamente 0.25 p.p.m..

As amostras de morango foram introduzidas na água ozonada durante 1, 2 e 3 minutos (pelo menos 4 réplicas).

**Tratamentos combinados.** Os tratamentos com ozono (2 minutos) foram combinados com tratamentos térmicos (branqueamentos a 50 e 55 °C, durante 1 minuto). Estes ensaios foram realizados de forma sequencial, aplicando-se primeiro o branqueamento e depois a lavagem em água ozonada, e vice-versa. Foram realizadas pelo menos 4 réplicas.

Amostras de morango foram lavadas em água (15 °C) e branqueadas (55 e 55 °C), para controlo de todos os tratamentos aplicados (pelo menos 4 réplicas).

### Análises microbiológicas

A enumeração de mesófilos totais foi efectuada segundo a norma NP 4405.

### Análise de dados

O efeito dos tratamentos foi avaliado calculando o logaritmo da razão entre a carga microbiana inicial das amostras não tratadas (N0) e após tratamento (N), traduzindo este valor a redução do número de ciclos logarítmicos da carga microbiana.

Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA a uma entrada, nível de significância de 5%), utilizando SPSS® 14.0 for Windows® (2006 SPSS Inc., Chicago, USA). Para comparação das médias foi aplicado o teste de Tukey.

## RESULTADOS

O teor de mesófilos totais nas amostras de morango antes de aplicação dos tratamentos (N0) foi de aproximadamente  $10^7$  UFC/mg.

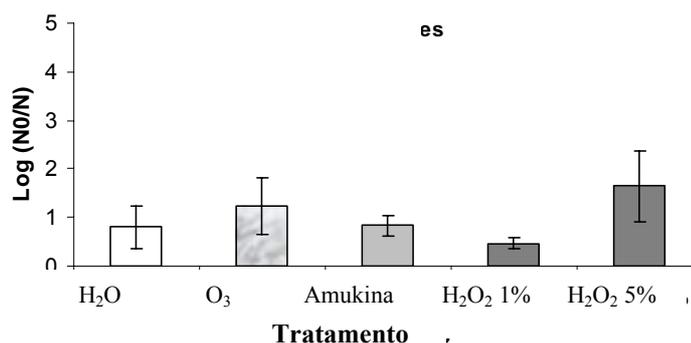
Na tabela 1 encontram-se os resultados de lavagens com água e branqueamentos (15, 50 e 55 °C, respectivamente) e lavagens com água ozonada, realizadas durante 1, 2 e 3 minutos. Estes ensaios foram efectuados apenas como tratamentos comparativos.

Na figura 1 são apresentadas as reduções de mesófilos totais nas amostras de morango, por aplicação dos tratamentos não térmicos (i.e. lavagens com água a 15 °C (controlo), água ozonada, e com soluções de agentes químicos).

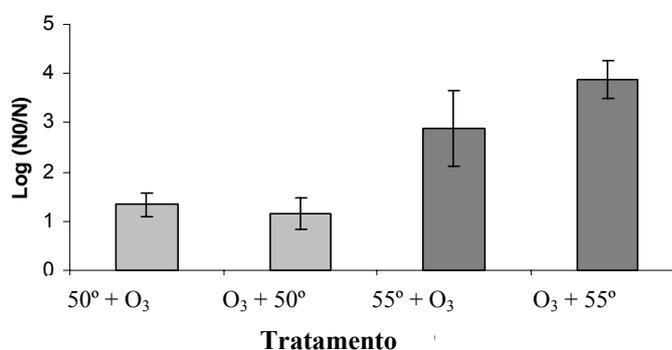
Os resultados da aplicação de tratamentos combinados (lavagens com água ozonada + branqueamento) podem ser observados na figura 2.

**Tabela 1.** Redução do número de ciclos logarítmicos de mesófilos totais presentes em amostras de morango, quando sujeitas a lavagens com água (15, 50 e 55°C) ou lavagem em água ozonada (15°C) durante 1, 2 e 3 minutos (tratamentos comparativos).

| Lavagem          | <i>Redução do número de ciclos logarítmicos</i> |            |            |
|------------------|---|------------|------------|
|                  | Tempo de tratamento (min)                       |            |            |
| H <sub>2</sub> O | 1   | 2          | 3          |
| 15 °C            | 1,3 ± 0,29                                      | 0,8 ± 0,44 | 0,3 ± 0,13 |
| 50 °C            | 0,8 ± 0,15                                      | 2,7 ± 0,51 | 3,1 ± 0,12 |
| 55 °C            | 4,3 ± 0,13                                      | 7,6 ± 1,69 | 7,5 ± 0,19 |
| Ozono            | 1   | 2          | 3          |
| 15 °C            | 1,6 ± 0,13                                      | 1,2 ± 0,58 | 1,7 ± 0,19 |



**Figura 1.** Efeito dos tratamentos não térmicos (H<sub>2</sub>O, O<sub>3</sub>, Amukina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na redução de mesófilos totais (as barras indicam desvio padrão dos valores).



**Figura 2.** Efeito da combinação de lavagens com água ozonada e tratamentos térmicos (50°C e 55°C) na redução de mesófilos totais em amostras de morango (as barras indicam desvio padrão dos valores).

## DISCUSSÃO

Relativamente aos tratamentos não térmicos, os resultados mostraram que o tratamento mais eficaz na redução da flora mesófila foi a lavagem com peróxido de hidrogénio a 5% (redução de cerca de 2 ciclos logarítmicos). Contudo, estes resultados não são significativamente diferentes (ANOVA a 5%) dos obtidos com lavagens com água, com água ozonada e com Amukina. O tratamento que conduziu ao menor número de ciclos reduzidos foi o peróxido de hidrogénio a 1% (redução de cerca de 0.5 ciclos logarítmicos).

Nos tratamentos combinados não foram observadas diferenças significativas entre amostras tratadas à mesma temperatura. Desta forma, a ordem pela qual foram efectuados os tratamentos (branqueamento vs ozono ou ozono vs branqueamento) não afectou os resultados. O efeito da temperatura foi notório: quanto mais elevada foi a temperatura de branqueamento (55°C) maior foi a redução da carga microbiana (cerca de 1 e 4 ciclos logarítmicos, respectivamente para as temperatura de 50 e de 55 °C).

Quando o efeito dos tratamentos combinados (50°C e 55°C) foi comparado com o tratamento térmico efectuado durante o mesmo período de tempo (1 minuto), não se verificaram diferenças significativas. Assim, o efeito dos tratamentos térmicos, a 50 e 55 °C, não foi potenciado quando combinado com lavagens em ozono.

## CONCLUSÕES

O tratamento não térmico mais eficaz, na redução de mesófilos totais em morango, foi a lavagem com peróxido de hidrogénio a 5% (redução de cerca de 2 ciclos logarítmicos). Estes resultados não são significativamente diferentes dos resultados obtidos com lavagens com água, com água ozonada ou com Amukina.

O efeito dos tratamentos térmicos, a 50 e 55 °C, não foi potenciado quando estes foram combinados com lavagens com ozono. Resultados semelhantes foram obtidos quando os tratamentos combinados foram aplicados por ordem alternada (*i.e.* branqueamento vs ozono ou ozono vs branqueamento).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro ao Programa Operacional Agricultura e Desenvolvimento Rural – Projecto AGRO nº822 (Novas Tecnologias de Processamento de Hortofrutículas Congelados – EMERCON). Os autores Alexandre E.M.C., Santos-Pedro D.M. e Brandão T.R.S. agradecem ainda à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (bolsas de investigação SFRH/BD/16042/2004, SFRH/BPD/9174/2002 e SFRH/BPD/11580/2002, respectivamente).

## BIBLIOGRAFÍA

- Dufresne, S.; Hewitt, A.; Robitaille, S. Ozone sterilization: Another option for healthcare in the 21<sup>st</sup> Century. *American Journal of Infection Control*, v. 32, p.3, 2004.
- Guzel-Seydim, Z.; Greene, A.K.; Seydim, A.C. Use of ozone in food industry. *Lebensm.-Wiss. u.-Techno.*, v.37, p.453-460, 2004.
- Ketteringham L.; Gausseres R.; James S.J.; James C. Application of aqueous ozone for treating pre-cut green peppers (*Capsicum annum L.*). *Journal of Food Engineering*, v.76, n.1, p.104-111, 2006.
- 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, G.; Yousef, A.E.; Khadre, M. Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, v.45, p.167-218, 2003.
- Manousaridis, G.; Nerantzaki, A.; Paleologos, E.K.; Tsiotsias, A.; Savaidis, I.N.; Kontominas M.G. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiology*, v.22, n.1, p.1-9, 2005.
- Philippon, J.; Rouet-Mayer, M.A. Blanching and quality of frozen vegetables and fruit. Review. 2. Sensorial aspects. *International Journal of Refrigeration*, v.8, n.1, p. 48-53, 2003.
- Rice, R.G.; Farguhar, J.W.; Bollyky, L.J. Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. *Ozone Science and Engineering*, v.4, p.147-163, 1982.
- Sapers, G.M.; Miller, R.L.; Mattrazzo, A.M. Effectiveness of sanitizing agents in inactivating *Escherichia coli* in Golden Delicious apples. *Journal of Food Science*, v.64, n.4, p.734-737, 1999.

- Ukuku, D.O.; Sapers, G.M. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella* Stanley attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. *Journal of Food Protection*, v.64, n.9, p.1286-1291, 2001.
- Ukuku, D.O.; Pilizota, V.; Sapers, G.M. Influence of washing treatment on native microflora and *Escherichia coli* population of inoculated cantaloupes. *Journal Food Safety*, v.21, n.1, p.31-47, 2001.
- Ukuku, D.O.; Bari, M.L.; Kawamoto, S.; Ishiki, K. Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reduction transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. *International Journal of Food Microbiology*, v.104, n.2, p.225-233, 2005.