

# REVISIÓN: EL OZONO Y SU UTILIZACIÓN EN LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

E. Aguayo, V.H. Escalona y F. Artés

Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Departamento de Ingeniería de Alimentos. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena. Murcia. España. encarna.aguayo@upct.es

## RESUMEN

El ozono ( $O_3$ ) es un potente oxidante y esterilizante, utilizado desde hace muchos años para desinfectar el agua en plantas potabilizadoras. Empleado en reducidas concentraciones y con un corto tiempo de contacto es muy eficaz para, inactivar bacterias, hongos, esporas, virus y protozoos. Actualmente se utiliza en la industria agroalimentaria, principalmente como sustituto del cloro en el agua de lavado y desinfección de materias primas y también como gas desinfectante del aire en cámaras de refrigeración. Los resultados sobre su eficacia son prometedores, aunque la susceptibilidad de los microorganismos a su acción depende del producto, dosis, método de aplicación (agua ozonizada o gas), temperatura, pH del medio, humedad relativa y presencia de sustancias orgánicas oxidables. En general, los estudios se han realizado sobre su eficacia desinfectante en suspensiones celulares puras, pero la presencia de materia orgánica propia de los componentes alimentarios exige mayores dosis de  $O_3$ . Se han realizado muy pocos trabajos sobre la desinfección de frutas y hortalizas después de su conservación frigorífica. En esta revisión tras recopilar las características físico-químicas y métodos de obtención y determinación de este gas, se analiza su utilización sobre alimentos vivos (frutas y hortalizas) lavados con agua ozonizada o conservados bajo  $O_3$  gas como coadyuvante. Finalmente se examina su influencia sobre la actividad metabólica y la calidad microbiológica, sensorial y nutritiva de los productos tratados.

## SUMMARY

The ozone ( $O_3$ ) is a powerful oxidant and sterilizing agent. It has been used in water plant disinfection for along time ago. Relatively low  $O_3$  levels and short contact time are sufficient to inactivate bacteria, molds, yeasts, parasite, viruses and spores. Nowadays,  $O_3$  is using in the food industry like an alternative to chlorine disinfection. The results reported about its efficacy are very encouraged. However, susceptibility of microorganisms to  $O_3$  varies with the kind of product, doses, temperature, pH of the medium, RH and oxidizable organic substances. In general, most of the experiments have been applied to pure cell suspensions, but the presence of organic matter (e.g., food components) increase the need for higher doses of  $O_3$ . Only a few studies are related to  $O_3$  and fruits and vegetables decontamination after a period of chilling storage. In this review, the studies linked to alive food (fruits and vegetables) treated with  $O_3$  water dip or gaseous  $O_3$  storage have been collected. In addition a brief exposition about physicochemical features and generation and measurement of  $O_3$  is also reported. The  $O_3$  applications effects on metabolic behaviour and microbial, sensorial and nutritive quality in fruits and vegetables are also described in this review.

## ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

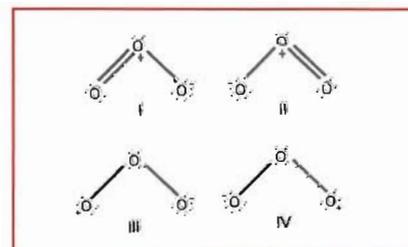
El ozono ( $O_3$ ), un oxígeno triatómico identificado en 1840, es un gas azulado a temperatura ambiente y de refrigeración, con un penetrante y característico olor acre (Horvath et al., 1985). Es un potente oxidante (una vez y media más fuerte que el cloro) y el quinto en potencial de oxidación termodinámica, tras el flúor, cloro, trifluoruro, oxígeno atómico y el radical libre hidroxilo (Tabla 1).

A  $-112^\circ\text{C}$ , el  $O_3$  condensa a un líquido azul oscuro (Tabla 2). El

ozono líquido explota fácilmente, si la mezcla de ozono-oxígeno es superior al 20%. El detonante de la explosión puede ser las descargas eléctricas, o cambios bruscos de temperatura o de presión. Sin embargo en la práctica, las explosiones de  $O_3$  son extremadamente raras (Guzel-Seydim et al., 2004a).

En la estructura de la molécula de  $O_3$ , los átomos de oxígeno ( $O_2$ ) de la molécula se organizan en su ángulo obtuso, por lo cual el átomo central de  $O_2$ , está unido a dos átomos de oxígeno equidistantes. El ángulo es aproximadamente  $116^\circ 49'$  y la longitud del enlace es de  $1,178 \text{ \AA}$ . La molécula posee cuatro estructuras resonantes (Guzel-Seydim et al., 2004a).

Estructuras resonantes de la molécula de ozono:



## FORMACIÓN DEL OZONO

La primera referencia histórica que se tiene del  $O_3$  fue en 1781 cuando Van Marum describió su peculiar olor des-

**TABLA 1**

Potencial de oxidación de los principales agentes oxidantes.

Agente oxidante	Potencial de oxidación (mv)
Fluor	3,06
Ozono	2,07
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Ácido hipocloroso	1,49
Cloro (gas)	1,36

Fuente: Horvath et al. (1985).

pués de que se produjera una descarga eléctrica en una tormenta. En 1841, Chonbein le asignó a este gas su actual denominación, que deriva del vocablo griego "oler" (Nadas et al, 2000).

El O<sub>3</sub> se produce de forma natural en la estratosfera, en pequeñas cantidades (0,05 mgL<sup>-1</sup>) por acción de las radiaciones ultravioleta (UV) del sol o durante las descargas eléctricas. Este gas se forma, principalmente, por la ruptura y reasociación de las moléculas de O<sub>2</sub>, presentes en el aire a causa de la acción de los rayos UV procedentes del sol, de manera que tres moléculas de O<sub>2</sub> dan lugar a dos de O<sub>3</sub>, la forma triatómica del oxígeno. Como consecuencia, el paso 3O<sub>2</sub> ⇌ 2 O<sub>3</sub> absorbe gran parte de la energía que incide en la atmósfera evitando que ésta llegue

con la intensidad inicial a la superficie terrestre y pueda afectar de manera dramática a su biosfera. Debido a esta reacción en la atmósfera terrestre existe, entre los 15 y 40 Km de altura, una capa con una mayor concentración de este gas, denominada ozonoesfera, que actúa como escudo protector de la tierra ante los rayos UV (Nadas et al., 2000).

La creciente degradación de la capa de O<sub>3</sub>, debido a sustancias como los compuestos clorofluorocarbonados (CFC), está produciendo un aumento de la radiación UV. En las capas cercanas a la superficie de la tierra se forma O<sub>3</sub> debido a la radiación UV de alta energía, especialmente en presencia de contaminantes como los gases nitrosos (Shirk, 2000).

**TABLA 2**

Propiedades físicas del ozono.

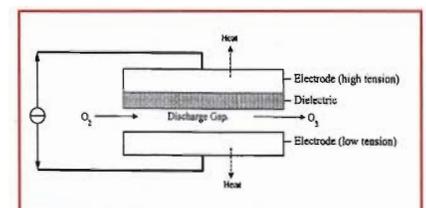
Peso molecular	48
Punto de ebullición	-111,9 ± 0,3°C
Punto de fusión	-192,5 ± 0,4°C
Temperatura crítica	-12,1°C
Presión crítica	54,6 atm

Fuente: Guzel-Seydim et al. (2004a).

En la superficie terrestre, el O<sub>3</sub> se forma artificialmente como subproducto de la utilización de los combustibles fósiles al reaccionar los hidrocarburos, liberados a la atmósfera principalmente por los complejos industriales y los automóviles, con O<sub>2</sub>, óxidos de nitrógeno y luz solar (Schraudner et al., 1997), formando parte de la llamada contaminación fotoquímica atmosférica, de la cual es el componente más nocivo para la vegetación (Heagle, 1989).

El método más utilizado para producir importantes cantidades de O<sub>3</sub> es el de descarga en corona ("corona discharge"): se usa un generador que está formado por dos electrodos, uno de alta y otro de baja tensión, separados por un medio dieléctrico pegado al electrodo de alta tensión, de forma que se crea un espacio entre la capa de material y el electrodo de baja tensión, llamado hueco de descarga (Guzel-seydim et al., 2004a).

**Esquema del método "descarga en corona" (Rice et al., 1982)**



Cuando se aplica una corriente alterna de alto voltaje a través del hueco de descarga en presencia de aire u O<sub>2</sub>, excita a los electrones del O<sub>2</sub>, produciéndose la ruptura de la molécula de O<sub>2</sub>; los dos átomos libres se combinan con dos moléculas de O<sub>2</sub> y se forman dos moléculas de O<sub>3</sub>. La producción de O<sub>3</sub> depende del voltaje, de la frecuencia de la corriente, de las propiedades y espesor del material dieléctrico, del hueco de descarga y de la presión absoluta dentro del hueco de descarga.

Si se utiliza aire como fuente de alimentación del generador, se produce del 1 al 3% de O<sub>3</sub>. Sin embargo, usando O<sub>2</sub> puro se puede conseguir un 6% de O<sub>3</sub>. La concentración de O<sub>3</sub> no puede incrementarse más allá del punto en el cual el porcentaje de destrucción y de formación son iguales (Guzel-seydim et al., 2004a).

Además del método fotoquímico y del método de la corona, el  $O_3$  se puede producir por métodos químicos, térmicos, quimionucleares y electrolitos. Un nuevo método en la producción de  $O_3$  implantado por Lynntech, es un proceso electroquímico, en el cual el agua se descompone en átomos de oxígeno que se combinan para formar  $O_3$  y moléculas de  $O_2$ , que al parecer produce sobre el 10 al 18 % de  $O_3$  en la mezcla resultante (Kim et al., 1999a).

El  $O_3$  se descompone en una disolución acuosa, produciendo radicales hidropéroxidos ( $HO_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ) y superóxido ( $O_2^-$ ). La reactividad del  $O_3$  se atribuye, en parte, al gran poder oxidante de estos radicales libres (Kim y Youssef, 2000). La descomposición acuosa de  $O_3$  es tan rápida en disolución acuosa, que en los alimentos su acción microbiana se da principalmente en la superficie (Kaess y Weidemann, 1968).

## MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL OZONO

Los métodos analíticos para la determinación de ozono pueden ser físicos, físico-químicos y químicos. Los métodos físicos están basados en la medida de propiedades de la partícula de  $O_3$ , como la intensidad de absorción en UV, visible, o región infrarroja del espectro. Los físico-químicos miden los efectos físicos de la reacción del  $O_3$  con diferentes agentes, como quimioluminiscencia o calor de reacción. Los químicos miden la cantidad de producto resultante de la reacción del  $O_3$  con reactivos apropiados (ej: KI, HI) o la reducción de peso molecular de un polímero. Estos métodos difieren en sensibilidad y precisión (Adler y Hill, 1950).

**Método iodométrico:** fue aprobado por la Asociación Internacional del Ozono. El  $O_3$  oxida al ión yoduro, liberando yodo; después es valorado con tiosulfato sódico y almidón como indicador del punto final. Este método no es solo para el  $O_3$  sino también para todas las especies oxidantes resultan-

tes de la descomposición del  $O_3$  en disolución (Gordon y Grunwell, 1983).

**Método índigo:** el método calorimétrico de índigo es preciso, rápido y sensible (el nivel más bajo de detección es  $0,005 \mu\text{g/mL}$ ). Fue aprobado por el Comité de Métodos Estándar para el examen de aguas y aguas residuales, en 1882, porque no producía interferencias por presencia de  $H_2O_2$ , peróxidos orgánicos, manganeso y especies oxidantes presentes en el agua potable. En este método, el  $O_3$  se adiciona a través del doble enlace C=C de la tintura de índigo sulfonado y lo decolora. El cambio de absorbancia se determina por espectrofotometría (Bader y Hoigné, 1981).

**Método espectrofotométrico:** para determinar con precisión el  $O_3$  en estado gaseoso debe usarse el método espectrofotométrico en UV. El  $O_3$  presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 253,7 nm y el coeficiente de absorción de la fase gaseosa es de  $300 \pm 30 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a  $273^\circ\text{K}$  y 1 atm (Gordon y Grunwell, 1983).

Los **métodos calorimétricos** para medir el  $O_3$  se basan en su descomposición en presencia de un catalizador produciendo calor.

Para medir el potencial de óxido-reducción se usan instrumentos basados en el **método amperométrico**. Este método usa una celda de medición de flujo continuo de dos electrodos metálicos diferentes para general una corriente proporcional al  $O_3$  presente (Khadre et al., 2001).

## MODO DE INACTIVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

El exceso de  $O_3$  se descompone rápidamente en  $O_2$  sin dejar residuos en los alimentos, produciendo un gran número de radicales libres siendo el más importante el hidroxilo ( $OH^-$ ). Algunos autores afirman que el  $O_3$  molecular es el principal inactivador de microorganismos mientras que otros sostienen que su actividad antimicrobiana se debe a la reacción de los radicales procedentes de la descomposición del  $O_3$  como  $^{\cdot}OH$ ,  $^{\cdot}O_2^-$  y

$HO_3^{\cdot}$  (Bablon et al., 1991b; Chang y Chim, 1996; Glaze y Kang, 1989; Harakeh y Butler 1985; Hunt y Marinas, 1997). Aunque esos radicales libres son oxidantes más poderosos, su vida media es corta (microsegundos) y no tienen un efecto significativo en la concentración. Pero la vida media de la molécula de  $O_3$  en el aire es relativamente larga (unas 12 horas) aunque en disolución acuosa depende de la cantidad de  $O_3$  que demande el material ozonizado.

La aplicación de  $O_3$  puede reducir significativamente la flora microbiana en la superficie de los alimentos (Achen, 2000) ya que su descomposición en la fase acuosa del alimento es rápida y su acción antimicrobiana tendrá lugar principalmente en la superficie (Kaess y Weidemann, 1968). La inactivación de microorganismos por el  $O_3$  es un proceso complejo dado que ataca a un gran número de constituyentes celulares: proteínas, lípidos insaturados y enzimas respiratorias en las membranas celulares, péptidoglicanos en envolturas celulares, enzimas y ácidos nucleicos del citoplasma, proteínas y péptidoglicanos en cubiertas de esporas y cápsides de virus, como se describe a continuación.

**Cubierta celular:** la superficie celular de la bacteria es el primer lugar de actividad del  $O_3$  (Khadre y Youssef, 2001). Scott y Leshner (1963) propusieron que los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados que componen la cubierta celular son el primer sitio de ataque. Otros componentes de las cubiertas celulares susceptibles de ser oxidados por el  $O_3$  son las membranas ligadas a enzimas, glicoproteínas y glicolípidos conduciendo a la salida del contenido celular y eventualmente causando la lisis (Murray et al., 1965). Cuando los lípidos insaturados y los grupos sulfhídricos de los enzimas son oxidados por el  $O_3$ , se altera la actividad celular normal, incluyendo la permeabilidad, seguida de la muerte. Así, tratando *Salmonella enteritidis* con soluciones ozonizadas se alteró la membrana celular. Sin embargo, Komanapalli y Lau (1996) observaron que la exposición corta (1-5 min) de *Escherichia coli* K-12 (*E. coli*) a 600 ppm  $O_3$  comprometía la permeabilidad de la membrana pero

sin afectar la viabilidad, que disminuía progresivamente con exposiciones superiores a 30 min.

**Cubierta de las esporas bacterianas:** las esporas de *Bacillus subtilis* tratadas con disolución ozonizada muestran una profunda interrupción de la cubierta externa. Estas esporas al estar desprovistas de sus proteínas de cubierta son inactivadas rápidamente por el O<sub>3</sub>, en comparación con las esporas intactas. Estas proteínas de la cubierta son una barrera de protección primaria frente al O<sub>3</sub> (Young y Setlow, 2004).

**Enzimas:** la inactivación de enzimas parece ser un importante mecanismo por el cual el O<sub>3</sub> destruye las células. Mientras el cloro destruye selectivamente ciertos enzimas, el O<sub>3</sub> actúa como un oxidante general proplásmico (Ingram y Barnes, 1954; Takamoto et al., 1992). Ingram y Barnes (1954) encontraron una destrucción general de los sistemas deshidrogenasa en la célula, proponiendo que el O<sub>3</sub> mataba a *E. coli* por interferir con el sistema respiratorio. Se sugirió que la oxidación de los grupos SH- y S-S en residuos de cisteína en la enzima era la principal causa de muerte. Takamoto et al. (1992) observaron que el O<sub>3</sub> en *Escherichia coli* inactiva en mayor grado la β-galactosidasa citoplasmática que la fosfatasa alcalina periplásmica.

**Material genético:** el O<sub>3</sub> puede inactivar microorganismos al dañar su material genético. En estudios *in vitro*, Scott (1975) e Ishizaki et al. (1981) con ADN de *E. coli*, observaron que las bases pirimidínicas, en especial la timina, son más sensibles al O<sub>3</sub> que citosina y uracilo. En otro estudio, el O<sub>3</sub> abrió el plásmido circular de ADN y redujo su capacidad de transformación, produciendo simples y dobles hebras rotas del plásmido de ADN y disminuyó la actividad transcriptora (Mura y Chung, 1990). Estudiando *E. coli*, l'Herault y Chung (1984) encontraron que el O<sub>3</sub> puede producir mutaciones. Sin embargo, otras investigaciones no detectaron ningún efecto mutagénico del ozono en *Salmonella* spp. (Victorin y Stahlberg, 1988). Investigaciones en *E. coli* determinaron que el O<sub>3</sub> puede inducir mutaciones, pero otras realizadas en *Salmonella* spp. no encontraron ese

efecto mutagénico y en *Saccharomyces cerevisiae* solo observaron un débil efecto mutagénico del O<sub>3</sub> (Khadre et al., 2001).

## ESPECTRO MICROBICIDA DEL OZONO

El O<sub>3</sub> es un agente antimicrobiano de amplio espectro; es activo contra bacterias (gram-negativas y gram-positivas), hongos, virus, protozoos y esporas fúngicas y bacterianas. Sobsey (1989), Restaino et al. (1995) y Deniniger y Lee (2000) averiguaron que las bacterias gram-positivas son más resistentes que las gram-negativas, con la excepción de *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, Kim et al. (1999b) encontraron resultados inconsistentes con las conclusiones citadas y la resistencia en orden descendente fue de *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Listeria monocytogenes*. Broadwater et al. (1973) determinaron un menor umbral letal para *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* que frente a sus esporas. El O<sub>3</sub> es generalmente más efectivo contra las bacterias celulares vegetativas que frente a esporas de bacterias y hongos (Kim et al., 1999b).

Además, el O<sub>3</sub> es un eficaz fungicida. Farooq y Akhlaque (1983) y Kawamura et al. (1986) comprobaron que también inactiva levaduras. Para Restaino et al. (1995) las levaduras parecen más sensibles que los mohos a los tratamientos de O<sub>3</sub>. Normalmente se requieren concentraciones más elevadas que para las bacterias (Rego et al., 2002). También el O<sub>3</sub> inactiva virus por atacar a la cápside: altera las cadenas de polipéptidos en la cubierta proteica oxidándolas y modificando la estructura tridimensional (Kim et al. 1980). Al ocurrir esto, el virus no puede anclarse a ninguna célula hospedadora por no reconocer su punto de anclaje (Roy et al., 1981). La acción viricida sucede a concentraciones inferiores a la bactericida dado que la complejidad de la envoltura vírica es inferior a la de la pared bacteriana (Rego et al., 2002).

No obstante, la cepa del microorganismo, la edad del cultivo, la densidad de población tratada, la demanda de O<sub>3</sub> de los componentes del medio, el método de aplicación de O<sub>3</sub> (agua o gas), la precisión de los procesos de medida y los dispositivos, y métodos para medir la eficacia antimicrobiana influyen en la determinación de la eficacia del O<sub>3</sub> (Khadre et al., 2001).

## FACTORES QUE AFECTAN A LA CANTIDAD DE OZONO DISPONIBLE

El O<sub>3</sub> es relativamente inestable en disoluciones acuosas, descomponiéndose continua, pero lentamente, a O<sub>2</sub> (Tomiyasu et al., 1985). La vida media del O<sub>3</sub> en agua destilada a 20°C se estima en 20 a 30 min. Sin embargo, Wynn et al. (1973) reportaron una vida media de 165 min en agua destilada a 20°C mientras Wickramanayake et al., (1984) informaron de una vida de 2 a 4 min en soluciones acuosas a pH 7.0 y 25°C. No obstante, la solubilidad del O<sub>3</sub> depende de la temperatura, pureza y pH del medio, como se describe a continuación.

## TEMPERATURA

El O<sub>3</sub> es parcialmente soluble en agua, cumpliendo la ley de Henry, por la que la cantidad de gas presente en la solución a una determinada temperatura es linealmente proporcional a la presión parcial del gas. Con el aumento de la temperatura el O<sub>3</sub> es menos soluble y estable pero la velocidad de reacción con el sustrato aumenta (Bablon et al., 1991). La temperatura determina parcialmente la velocidad a la cual puede difundirse a través de la superficie del microorganismo y su velocidad de reacción con el sustrato. Wickramanayake et al. (1984) observaron que al aumentar la temperatura de 0 a 30°C, la velocidad de inactivación de *Giardia cysts* aumentaba. Sin embargo, Kinman (1975) no observó ningún

**TABLA 3**  
Solubilidad del ozono en agua

Temperatura (°C)	Solubilidad (L ozono/L agua)
0	0,640
15	0,456
27	0,270
40	0,112
60	0,000

Fuente: Khadre et al. (2001).

efecto en la velocidad de desinfección entre 0 y 30°C. Al parecer cuando la temperatura aumentó, el aumento en la reacción del O<sub>3</sub> era compensado por la disminución en su estabilidad sin producirse ningún cambio. Kim et al. (1999a) observaron que reducía la carga microbiana cuando se aplicaba a temperaturas superiores a las de refrigeración.

Según Wickramanayake et al. (1984), cuando la temperatura aumenta de 0°C a 10°C, la tasa de inactivación de quistes de *Giardia* aumenta. Sin embargo, Kinman (1975), expuso que cuando se tratan las bacterias con O<sub>3</sub> entre 0°C y 30°C, la temperatura del tratamiento no afectaba prácticamente al índice de desinfección, relacionando esta observación con la menor solubilidad y el aumento de la descomposición y la reactividad del O<sub>3</sub> conforme aumentaba la temperatura. Achen (2000) trataron manzanas contaminadas con *E. coli* con O<sub>3</sub> a 4, 22 y 45°C, determinando que el recuento de bacterias en la superficie se redujo en 3,3; 3,7 y 3,4 unidades logarítmicas, respectivamente. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre los tres tratamientos. La mayor concentración de O<sub>3</sub> residual se encontró a 4°C y se redujo al aumentar la temperatura. Parece ser que al aumentar la temperatura de tratamiento, el incremento en la reactividad del O<sub>3</sub> compensó la disminución de su estabilidad y por eso no se detectó ningún cambio en la eficacia.

## pH

El pH del agua afecta mucho a la velocidad de solubilización del O<sub>3</sub>. La disolución es más rápida en agua desionizada y destilada con pH por debajo de 6 que en agua corriente con un pH de 8,3. El elevado pH del agua de la red puede desestabilizar el O<sub>3</sub> disminuyendo su velocidad de solubilización. Leiguarda et al. (1949) observaron que la eficiencia bactericida del O<sub>3</sub> en *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* era algo mayor a pH 6,0 que a 8,0. Foegeding (1985) encontró que el pH ácido incrementaba la letalidad del O<sub>3</sub> sobre esporas de *Bacillus* y *Clostridium*. Asimismo, la estabilidad del O<sub>3</sub> en la disolución disminuye cuando el pH aumenta (Kim et al., 1999b). El O<sub>3</sub> se descompone a elevado pH generando radicales que contribuyen a su eficacia. La importancia relativa de estos dos mecanismos de inactivación varía con el microorganismo y condiciones de tratamiento. No obstante, la actividad desinfectante del O<sub>3</sub> no se ve afectada por un pH del agua entre 6 y 8.5 (Suslow, 2003).

## PUREZA

Los microorganismos pueden encontrarse asociados a materia orgánica suspendida en la disolución, estorbando la accesibilidad del O<sub>3</sub>. El

mezclado, burbujeo o turbulencia aumenta el contacto con las burbujas y la solubilización en agua y además rompe los grupos de microorganismos (Katzenelson et al., 1974; Kim et al., 1999a). Por ello, el diseño de agitadores o la sonicación (Burlison et al., 1975) de O<sub>3</sub> en agua aumenta su velocidad de solubilización (Schulz y Bellamy, 2000). No obstante, la sonicación puede aumentar la descomposición de O<sub>3</sub> o aumentar la demanda del mismo al separar los materiales orgánicos de los productos vegetales cortados (Kim y Yousef, 2000).

La velocidad del flujo de O<sub>3</sub> y el tiempo de contacto también afecta a la transferencia del gas en el agua. Ameer (2004) encontró que los lavados con agua ozonizada (0,4 ppm) en escarola mínimamente procesada en fresco, aplicados en duchas incrementaron el efecto microbicida del O<sub>3</sub>, frente a la inmersión directa del producto en agua ozonizada. Además, la realización de un prelavado de la escarola entera, resultó ser muy eficaz, reduciendo de forma significativa la materia orgánica inicial y, permitiendo un contacto más íntimo entre la escarola y el O<sub>3</sub>.

La presencia de sustancias orgánicas compiten con los microorganismos ya que, al demandar O<sub>3</sub>, reducen la dosis del mismo (Ingram y Barnes, 1954). La sensibilidad de los microorganismos al O<sub>3</sub> está muy afectada no sólo por la cantidad sino también por la naturaleza de esa materia orgánica en el medio (Restaino et al., 1995). Estos autores comprobaron que el tipo de materia orgánica es más importante que la cantidad presente. Así, la materia orgánica en agua asociada al alimento es muy indeseable. Además, ciertos subproductos procedentes de la acción del O<sub>3</sub> en compuestos orgánicos pueden acortar la vida útil, cambiar la calidad organoléptica o poner en peligro la seguridad del producto final.

Guzel-Seydim et al. (2004b) trabajaron en la eficacia del O<sub>3</sub> para reducir la población bacteriana en componentes alimentarios en presencia de fuentes de ácidos grasos, proteínas y carbohidratos. Estos extractos se inocularon con esporas de *Bacillus stearothermophilus* o con células vegetativas de

*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y, posteriormente se ozonizaron. Se observó que la nata y el caseinato sódico proporcionaron el nivel más alto de protección frente al O<sub>3</sub>.

Otras aplicaciones del O<sub>3</sub> en agua se dirigen a reducir los residuos de pesticidas, compuestos orgánicos presentes en el agua (demanda biológica de oxígeno, DBO, o demanda química de oxígeno, DQO) o sólidos en suspensión, ya que el O<sub>3</sub> facilita la floculación y precipitación de los mismos y puede convertir muchos materiales orgánicos no biodegradables en formas biodegradables (Kim et al., 1999b). Smilanick et al. (1999) destruyeron en más del 95% la presencia de hongos como imazalil, tiabendazol y orto-fenil fenol tras 30 min de ozonización. Con esta técnica, McKenzie et al. (1997), observaron que lavando fresas con agua ozonizada (4 ppm) la flora mesófila, sólidos suspendidos, DBO y DQO disminuía en un 99,2%, 43%, 33% y 43%, respectivamente.

## HUMEDAD RELATIVA (HR)

Para obtener un óptimo aprovechamiento del O<sub>3</sub> como gas de conservación, hay que tener en cuenta la HR del medio. Elford y Ende (1942) observaron que con HR inferior al 45% el poder germicida del O<sub>3</sub> era insignificante. Los microorganismos son destruidos más rápidamente por O<sub>3</sub> en una atmósfera de elevada HR que baja ya que éstos desecados son más resistentes que las células hidratadas (Ewell, 1950).

Kim y Youssef (1999) utilizaron baja concentraciones de O<sub>3</sub> a HR variables para desinfectar microorganismos transmitidos por el aire. Con HR inferior al 45%, el poder bactericida del O<sub>3</sub> fue casi nulo. La inactivación fue sustancial incluso a concentraciones muy inferiores a 0,1mg/l cuando se utilizó alta HR. Se descubrió que no solo los microorganismos desecados eran más resistentes que las células hidratadas a la esterilización con O<sub>3</sub>, sino que una vez desecada, algunas células eran difíciles de rehidratar lo suficiente como para ser susceptibles a la esterilización por O<sub>3</sub>. Por tanto, el O<sub>3</sub>

sólo era efectivo como inhibidor para microorganismos no deshidratados.

Por todo lo expuesto, la sensibilidad de los microorganismos al O<sub>3</sub>, depende no sólo de la dosis sino de su efecto residual en el medio después de haber sido consumido por otros componentes. Venosa (1972) señaló que uno de los fracasos más serios del O<sub>3</sub> ha sido la incapacidad para distinguir entre la concentración aplicada y la dosis residual efectiva en la desinfección.

## MÉTODOS DE APLICACIÓN DE OZONO: LAVADOS CON AGUA OZONIZADA O CONSERVACIÓN EN GAS OZONADO

El O<sub>3</sub> puede aplicarse de dos formas, en disoluciones acuosas o de forma gaseosa en aire. Según el método elegido los factores a controlar serán distintos, así como la eficacia del tratamiento en el producto en cuestión. A continuación, se exponen los resultados según la técnica utilizada.

## APLICACIÓN DE OZONO MEDIANTE LAVADOS OZONIZADOS

En este apartado surge el interés por el O<sub>3</sub> como sustituto del cloro, ya que algunas aplicaciones comerciales muestran que puede reemplazar a desinfectantes tradicionales proporcionando otros beneficios (Artés, 2004; Bott, 1991; Cena, 1998; Cherry, 1999; Graham, 1997; Kim et al., 1999a). La ventaja más importante de este gas es que es efectivo a muy bajas concentraciones (0,01 ppm o menos) y durante períodos de exposición muy cortos, incluso con efecto bacteriostático (Beltrán, 1995). La principal función que se le atribuye es su acción microbicida (Rego et al., 2002) con un espectro más amplio frente a los microorganismos que el cloro (Kradre et al., 2001).

Actualmente, organizaciones de la salud y del medio ambiente han expresado su preocupación con respecto al cloro por la formación de residuos químicos en el agua residual que recaen en el medio ambiente, o la formación de compuestos perjudiciales para la salud como trihalometanos (THM) y cloraminas considerados tóxicos para el hígado y el riñón (Cena, 1998; Graham, 1997; Kim et al., 1999a; Wei et al., 1999). Estos THM se forman por la reacción del cloro libre (HOCl, OCl<sup>-</sup>) con compuestos orgánicos y el nivel máximo tolerado de THM en el agua es de 100 µg·L<sup>-1</sup> (Código Americano de Regulación, 1997). El cloro suele usarse en la industria hortofrutícola para mejorar la calidad microbiológica y el control de patógenos, pero recientes estudios han mostrado sus limitaciones para destruir bacterias en la superficie de frutas y hortalizas (Bott, 1991; Cena, 1998; Graham, 1997; Rice et al., 1982; Sapers, 1998). Además, la industria agroalimentaria genera gran cantidad de agua residual con elevadas cantidades de DBO y residuos químicos, que causan muchos problemas como enfermedades, muerte de peces, contaminación de aguas y ecosistemas dañados. Por ello, la industria debe tratar esos residuos o pagar importantes cánones por evacuarlos en la red pública de saneamiento.

El O<sub>3</sub> gas permite la recirculación y reutilización del agua de lavado de frutas y hortalizas tras una filtración, al eliminar el color, olor y turbidez del agua tras reducir las cargas orgánicas (Langlais et al., 1991; Rice, 1999).

En 1997, en EEUU un panel de expertos revisó la seguridad y potencialidad del O<sub>3</sub> para la industria alimentaria y lo apoyó como un agente generalmente reconocido como seguro (GRAS) para las aplicaciones en contacto con los alimentos (USDA, 1997). Este trabajo se sometió a la Food and Drug Administration (FDA) que aún no se ha pronunciado (Artés, 2004), aunque su uso en productos alimentarios es legal en EEUU (Rice, 1999). A mediados de los años noventa, el O<sub>3</sub> fue aprobado para la industria alimentaria en Japón, Francia y Australia. La mayoría de

usos se dirigen al tratamiento y desinfección de aguas municipales, plantas de embotellado, piscinas, desinfección de los sistemas de humificación, en numerosos países como Francia, Países Bajos, Alemania, Austria y Suiza (Smilanick et al., 1999; Graham, 1997), con más de 3.000 instalaciones de tratamiento de agua en todo el mundo (Rice et al., 2000). Actualmente, la ozonización se utiliza cada día más en el lavado de frutas y hortalizas por su acción antimicrobiana como se comenta a continuación.

**Eficiencia de los lavados ozonizados en frutas y hortalizas**

**Control microbicida**

La aplicación más importante del O<sub>3</sub> en disolución acuosa radica en el lavado de frutas y hortalizas, mejorando su seguridad alimentaria al controlar los patógenos en la superficie (Parish et al., 2003). Numerosos autores han trabajado tanto en suspensiones celulares como en productos hortícolas (Beltrán et al., 2003; Hampson y Fiori, 1997; Kim et al., 1999a; Rego et al., 2002; Singh et al., 2002a; Smilanick et

al., 1999; Spotts y Cervantes, 1992).

Se ha demostrado una gran eficacia del O<sub>3</sub> cuando los microorganismos son suspendidos y tratados en agua pura (con baja demanda de O<sub>3</sub>) que en los sistemas complejos como los alimentos (Khadre et al., 2001). Rego et al. (2002) inocularon diferentes microorganismos obteniendo suspensiones en agua pura de 5 unidades log. Tras la exposición de estas suspensiones en agua ozonizada la cepa *Xanthomonas campestris* CECT97 se eliminó totalmente a los 2 min y medio. No obstante, en las cepas de *Pseudomonas marginalis* CECT229, *Pseudomonas cichorii* CECT4471 y *Erwinia carotovora* CECT314 se obtuvo una disminución de una unidad decimal al medio minuto, tercer o tercer minuto y medio, respectivamente. Ninguna de estas cepas fue completamente eliminada a los 5 min. Según estos autores, en muchos casos el O<sub>3</sub> no elimina completamente un hongo o bacteria pero causa un descenso en sus niveles. En cambio, Kim et al. (1999b) redujeron entre 1,5 y 5 unidades log los conteos de *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas fluores-*

*centis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Listeria monocytogenes* con 1,5 ppm de O<sub>3</sub> (pH = 6 y 25°C) durante 15 segundos. Broadwater et al. (1973) publicó que el umbral letal para formas vegetativas de *Bacillus cereus* era de 0,12 ppm y para *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium* de 0,19 ppm, mientras que el umbral de concentración letal para esporas de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* era de 2,3 ppm. Restaino et al. (1995) destruyeron instantáneamente más de 4,5 unidades log de *Candida albicans* y *Zygosaccharomyces bailii* con 5 min de exposición en agua ozonizada (0,19 ppm). Farooq y Akhlaque (1983) comprobaron que la población de *Candida parapsilosis* decrecía en 2 unidades log cuando las levaduras se exponían a 0,26 ppm O<sub>3</sub> durante 1,7 min y la de *C. tropicalis* disminuyó en 2 unidades log con 0,02 ppm O<sub>3</sub> durante 20 s ó 1 ppm durante 5 s (Kawamura et al., 1986).

Sin embargo, cuando se desea inactivar los microorganismos presentes en un alimento se requieren mayores dosis de O<sub>3</sub> para eliminarlos, ya que los constituyentes orgánicos del alimento reaccionan fácilmente con el O<sub>3</sub> reduciendo su capacidad desinfectante. Así, Smilanick et al. (1999) con 10 ppm O<sub>3</sub> en agua durante 1 a 4 min lograron mermar la colonización de *Botrytis cinerea* en un 50% en uva de mesa aunque la efectividad fue irregular. De forma similar, la incidencia de podredumbre agria en naranjas y uvas inoculadas con *Geotrichum citriauranti* tratadas durante 5 min con 12 ppm O<sub>3</sub> fue del 78%. Se obtuvieron resultados similares con limones, incluso cuando el tiempo de contacto con el agua ozonizada era de 20 min. Según estos autores, y como observaron Spott y Cervantes (1992) en peras y Ogawa et al. (1990) en tomates, el tratamiento de patógenos inoculados en heridas de frutas fracasa incluso después de un prolongado tratamiento con elevadas concentraciones de O<sub>3</sub> en agua, dado que reacciona con el tejido de la planta y con lugares extracelulares de la herida imposibilitando la inactivación de los microorganismos. Cuando Kim et al. (1999b) lavaron

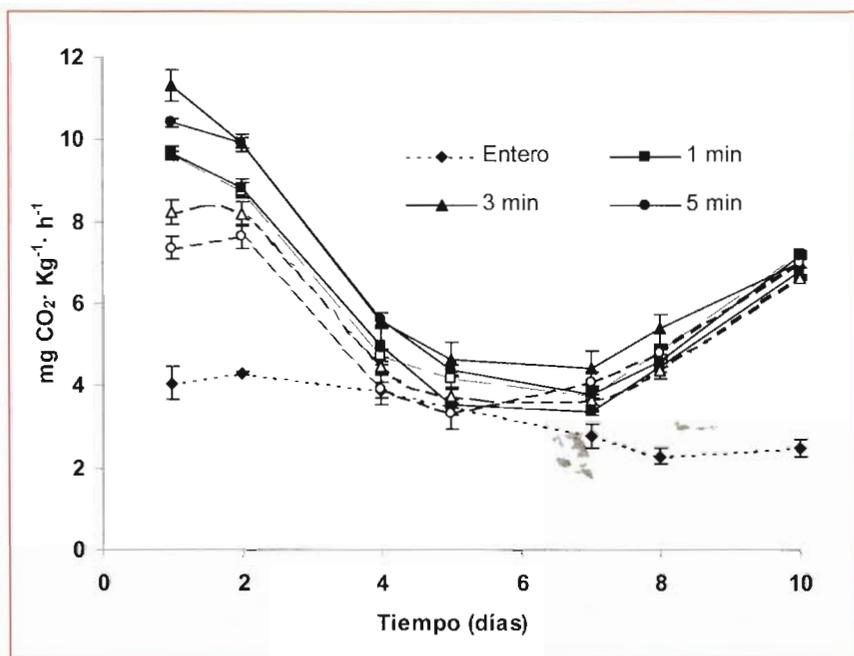


Fig. 1: Tasa respiratoria de melón Amarillo lavado en agua con o sin O<sub>3</sub> durante 1, 3 ó 5 min y conservado durante 10 días a 5°C. Media (n = 5) ± error estándar. Líneas continuas y marcador sólido: Melón procesado en fresco lavado con agua ozonizada. Líneas discontinuas y marcador transparente: Melón procesado en fresco lavado con agua sin ozonar. Línea punteada: Melón entero sin tratamientos de lavado.

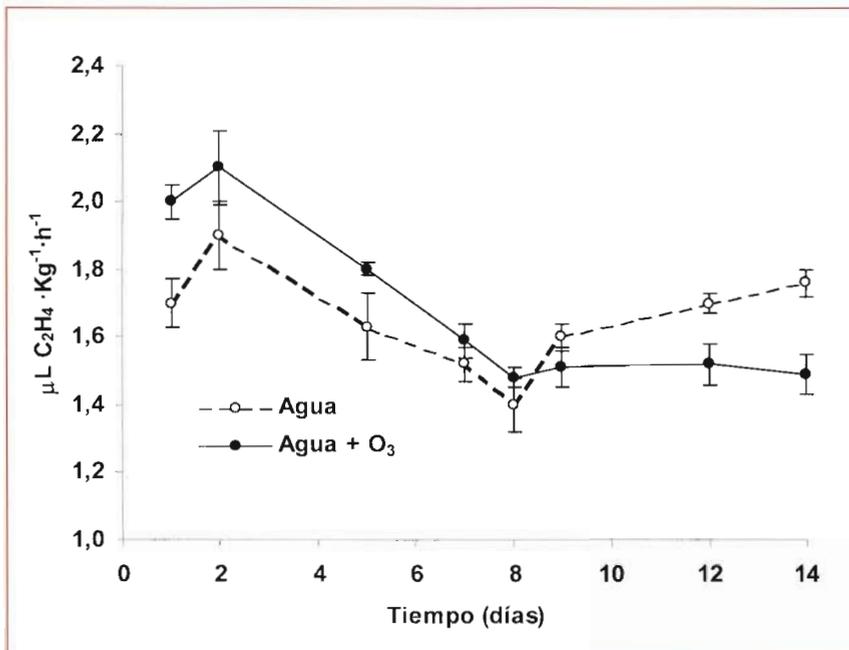


Fig. 2: Emisión de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> de rodajas de tomate Thomas lavado en agua con o sin O<sub>3</sub> durante 5 min y conservado durante 14 días a 5°C. Media (n = 5) ± error estándar.

lechuga cortada inyectando 62,4 ppm O<sub>3</sub> a 25°C y un flujo de 0,5 L · min<sup>-1</sup> en una mezcla de agua en lechuga de 1:20 (p/p) bajo elevada agitación durante 3 min, obtuvieron una reducción de la flora natural de 1,2 unidades log en mesófilos y 1,8 log en psicrotrofos. La inactivación aumentó con el tiempo de exposición, después de 5 min, las reducciones fueron de 3,9 y 4,6 ufc · g<sup>-1</sup> para mesófilos y psicrotrofos, respectivamente. En coles chinas, obtuvieron una reducción del 90% en el recuento total por ese mismo método.

Aún así, estos resultados son muy optimistas debido a las altas concentraciones de O<sub>3</sub> utilizadas. Otros resultados mucho más discretos han sido expuestos por Singh et al. (2002b) en lechuga y zanahoria, donde los tratamientos con agua ozonizada (5,2 ppm) no redujeron la población bacteriana inoculada con *E. coli* (8 log ufc · g<sup>-1</sup>) tras 1,5, 10 ó 15 min de lavado. Sin embargo, la reducción en zanahoria después de 10 ó 15 min de exposición fue de 0,43 unidades log. Con 16,5 ppm O<sub>3</sub> durante 15 min obtuvo una reducción de 0,49 ufc · g<sup>-1</sup> en lechuga y 0,57 en zanahorias frente al testigo. Según estos autores, la reducida eficacia del agua ozonizada en lechuga, probablemente se debió a la mayor demanda de O<sub>3</sub> del mate-

rial orgánico del medio, ya que según Restaino et al. (1995) el tipo de material orgánico presente durante la ozonización es más importante que la cantidad presente. Singh et al. (2002a) redujeron 1,47 unidades log de *E. coli* con el lavado de lechuga en agua ozonizada (10 ppm durante 5 min) una población inicial de 7,82. Cuando la población inicial fue más baja, del orden de 3,71 unidades log, la reducción fue de 1,63 unidades log.

A estas observaciones y resultados debe añadirse que pocos investigadores estudian la disminución de la población microbiana en productos vivos después de un periodo de conservación, donde las diferencias con el testigo pueden ser todavía más estrechas. Beltrán et al. (2003) trataron bastones de patata y rodajas de zanahoria con agua ozonizada (3,7 ppm) durante 7,5 ó 15 min. Tras una semana de conservación a 8°C, el O<sub>3</sub> (7,5 min) redujo los mesófilos aerobios totales en 0,61 unidades log en patata y 1 unidad log en zanahoria. Con 15 min de aplicación se logró una disminución de 0,47 y 0,3 unidades log en las bacterias acidolácticas de patata y zanahoria respectivamente. En melón 'Amarillo' mínimamente procesado en fresco y conservado 10 días a 5°C, Aguayo (2003) obtuvo con lavados ozonizados (3 min, 6,5 ppm)

reducciones microbianas de 1,2; 0,2; 0,4 y 1,5 log ufc · g<sup>-1</sup> en la flora de mesófilos, psicrotrofos, levaduras y mohos, respectivamente. Asimismo, en tomate 'Thomas' procesado en fresco, el O<sub>3</sub> redujo la flora inicial bacteriana desde 1,7 ufc · g<sup>-1</sup> a menos de 1 ufc · g<sup>-1</sup>. En este producto, después de 10 días a 5°C, se logró una notable reducción con los lavados ozonizados (3 min y 3,8 ppm). Las diferencias con respecto al testigo fueron de 1,9; 1,6 y 0,7 unidades log en los recuentos de mesófilos, psicrotrofos y levaduras, respectivamente (Aguayo, 2003). Zhang et al. (2004) redujeron en 1,69 log ufc · g<sup>-1</sup> la flora microbiana de apio mínimamente procesado en fresco con tan sólo 0,18 ppm O<sub>3</sub> en agua.

#### Metabolismo y parámetros fisiológicos

Diversos autores han encontrado una reducción en la tasa respiratoria, e incluso en la emisión de etileno al lavar frutas u hortalizas con agua ozonizada. No obstante, este comportamiento no es universal y depende del tipo de producto y dosis utilizada.

Aguayo (2003) obtuvo, tanto en melón 'Amarillo' como en tomate 'Thomas' procesados en fresco, una tasa respiratoria y emisión de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ligeramente mayor en los lavados ozonizados que el testigo, pero sólo durante los dos primeros días (Fig. 1). A partir del octavo día, el procesado lavado en agua sin ozonizar aumentó la emisión de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> superando a los tratamientos ozonizados, probablemente debido a una mayor contaminación fúngica (Fig. 2).

También, Zhang et al. (2004) redujeron la tasa respiratoria de apio mínimamente procesado en fresco con 0,18 ppm O<sub>3</sub> en agua. Beltrán et al. (2003) lavaron bastones de patata y rodajas de zanahoria con agua ozonizada (3,7 ppm) durante 7,5 ó 15 min y los almacenaron durante 7 días a 8°C. Estos tratamientos, y en particular el de 7,5 min, incrementaron la tasa respiratoria de la zanahoria procesada (18 mL CO<sub>2</sub> · Kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>) durante los dos primeros días frente al testigo (13 mL CO<sub>2</sub> · Kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>), sin diferencias en los últimos días de conservación. En cambio, en los bastones de patata no hubo diferencias significativas entre testigo y el lavado con O<sub>3</sub>.

### Calidad sensorial y nutritiva

La calidad sensorial de algunas frutas y hortalizas enteras puede mejorar con lavados ozonizados (Lewis et al., 1996; Morell et al. 1993), al disminuir el consumo de O<sub>2</sub>, la actividad catalasa y peroxidasa y el crecimiento superficial de microorganismos (Kim et al., 1999a), y también al inhibir el posterior sabor a "moho" (Aguayo, 2003). García et al. (2001) inocularon 7 unidades log en lechuga mínimamente procesada con una mezcla de microflora natural obteniendo mejor calidad sensorial combinando tratamiento clorados (100, 150 ó 200 ppm) y ozonizados (2,5, 5 ó 7,5 ppm) lo que prolongó 23 días la vida comercial frente a 18 con agua ozonizada y 16 del tratamiento con cloro, todos ellos a 10°C.

El ablandamiento, uno de los parámetros más considerados por los consumidores de frutas y hortalizas, también puede reducirse al lavar el producto con agua ozonizada. Aguayo (2003) encontró en tomate procesado en rodajas, tras 14 días a 5°C, un ablandamiento del 26% frente al 50% del testigo lavado en agua sin ozonizar. Sin embargo, esto no ocurrió cuando se realizaron lavados similares en melón procesado. Tampoco Avena-Bustillos et al. (2002) observaron cambios en la textura en tomate entero con lavados de 5, 10 y 15 min a 1,8 ppm. En cambio, Morell et al. (1993) incrementaron la textura con la inmersión de champiñones en agua ozonizada (sin especificar la dosis).

También, estos lavados pueden promover, como sucedió en melón y tomate procesado en fresco, una reducción en el consumo de azúcares consecuencia de una actividad metabólica más ralentizada (Aguayo, 2003).

### APLICACIÓN DE OZONO GASEOSO

#### Eficiencia en la conservación en gas ozonado.

La aplicación del O<sub>3</sub> como gas en aire, para desinfectar cámaras de conservación o durante el transporte frigorífico previene el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras en la superficie de los alimentos y controla insectos.

### Control microbicida.

Ozonizando la atmósfera (0,4 ppm) de cámaras frigoríficas se reduce la concentración de etileno a través de la reacción química (H<sub>2</sub>C=CH<sub>2</sub> + O<sub>3</sub> <=> CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O) presente en el aire pudiendo almacenar frutas y hortalizas emisoras de etileno conjuntamente con productos sensibles al etileno mejorando la calidad de éstos (Skog y Chu, 2000). Rice et al. (1982) recomendaron aplicar en cámaras frigoríficas entre 1 y 2 ppm O<sub>3</sub> por hora para evitar oxidaciones y maximizar su efecto beneficioso.

Baranovskaya et al. (1979) redujeron el crecimiento de bacterias en patatas, cebollas y remolacha azucarera con 3 ppm O<sub>3</sub>. Aguayo et al. (2005) redujo la flora mesofílica y psicrotrofica en 1,07 y 1,27 unidades log, de rodajas de tomate 'Thomas' procesado en fresco y conservado bajo un flujo cíclico de 4 ppm O<sub>3</sub> aplicado 30 min cada 3 h. La reducción en levaduras y mohos fue de 0,45 y 1,2 unidades log, respectivamente. En otro experimento similar con la misma variedad pero aplicando 7 ppm O<sub>3</sub>, las reducciones microbianas tras 15 días de conservación a 5°C fueron espectaculares, llegando a 3,6 unidades log en mesófilos y psicrotrofos y a 1,4 y 1,8 unidades log en levaduras y mohos filamentosos, respectivamente. Luego, a mayores concentraciones de O<sub>3</sub> la actividad antimicrobiana aumenta (Aguayo, 2003). Krause y Weidensaul (1977) también observaron que conforme aumentaba la dosis de O<sub>3</sub> la germinación de *Botrytis cinerea* y el crecimiento del tubo de germinación disminuía.

Los estudios realizados aplicando O<sub>3</sub> gas para inhibir el desarrollo de mohos son más numerosos que para el bacteriano. Liew y Prange (1994) inocularon *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* y las expusieron a O<sub>3</sub> gas (7,5, 15, 30 y 60 µg·L<sup>-1</sup>) 8 h/día durante 28 días a 2, 8 y 16°C. El crecimiento aumentó con la temperatura de conservación y la magnitud del aumento se redujo al incrementar la concentración de O<sub>3</sub>. Con 60 µg·L<sup>-1</sup> se redujo el crecimiento a la mitad comprobando el efecto fungistático, no fungicida, del O<sub>3</sub>. La aplicación de choques de 8 ppm O<sub>3</sub>, durante 43

días de conservación 0°C de uva "Napoleón" en ciclos de 30 min seguidos de 2,5 h de aireación continua, perdieron su eficacia para inhibir el desarrollo fúngico al cesar su aplicación durante la comercialización (Artés-Hernández et al., 2001). Palou et al. (2002) expusieron melocotones a ozonizaciones continuas de 0,3 ppm logrando inhibir el crecimiento del micelio aéreo y esporulación de *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Mucor piriformis* o *Penicillium expansum* inoculados en melocotones "Elegant Lady" y conservados 4 semanas a 5°C y 90% HR. La exposición a O<sub>3</sub> no redujo la incidencia y severidad de las pudriciones causadas por estos hongos salvo la podredumbre parda. Sin embargo, *Botrytis cinerea* fue totalmente inhibida en uva de mesa "Thompson Seedless". Probablemente estos discretos resultados se debieron a la baja concentración utilizada.

Otros autores que no obtuvieron diferencias en los recuentos microbianos con la utilización de concentraciones similares fueron Pérez et al. (1999) donde el tratamiento de O<sub>3</sub> (0,35 ppm) fue ineficaz para prevenir *Botrytis cinerea* en fresas tras 4 días a 20°C precedidos de 3 días a 2°C. Sin embargo, Barth et al. (1995) conservaron zarzamoras a 2°C con 0,3 ppm O<sub>3</sub> suprimiendo el crecimiento fúngico. Aplicando 0,2 µg/l O<sub>3</sub> durante 8 h/día y 5 días/semana a cebolla y patatas se inhibió el crecimiento de microorganismos superficiales. Krause y Weidensaul (1977) inhibieron la esporulación y germinación de *Botrytis cinerea* tanto *in vivo* como *in vitro* aplicando 0,3 ppm O<sub>3</sub> durante dos periodos de 6 h. Esta aplicación disminuyó la germinación de los conidios, longitud del tubo de germinación, patogenicidad y virulencia. Heagle y Strickland (1972) también inhibieron el crecimiento del micelio junto con la esporulación de colonias fúngicas. Hibben y Stotzky (1969) demostraron la diferente sensibilidad al O<sub>3</sub> de las esporas dependiendo de la especie fúngica, morfología de la espóra, humedad, sustrato y dosis de O<sub>3</sub>.

Sarig et al. (1996) redujeron la población en uvas con tan sólo 8 µg ·L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub> durante 1 min logrando la elimina-

ción total de mohos, levaduras y bacterias con 20 a 40 min de exposición, incluso en bayas inoculadas con *Rhizopus stolonifer*, sin causarles fitotoxicidad, salvo cuando el tiempo de exposición se prolongó. Según estos autores, la efectividad de una corta exposición a O<sub>3</sub> se debía al efecto fungicida del gas y a su capacidad para inducir la síntesis de fitoalexinas (estilbeno, resveratrol y pterostilbeno).

Como el O<sub>3</sub> gas tiene menor efecto bactericida en aire que en agua, deben emplearse concentraciones elevadas para que su acción sea efectiva (Rice et al. 1982). No obstante, a bajas concentraciones (1 ppm), el O<sub>3</sub> puede estimular el crecimiento bacteriano. Además, algunas bacterias pueden adaptarse a bajos niveles de O<sub>3</sub> tras un tratamiento prolongado. Sin embargo, sólo son necesarias pequeñas concentraciones de O<sub>3</sub> para prevenir el crecimiento de mohos superficiales aunque se requieren concentraciones elevadas para destruir las colonias fúngicas existentes.

#### Metabolismo y parámetros fisiológicos

Como sucedió con los lavados de agua ozonizada, la aplicación de O<sub>3</sub> gas en tomate 'Thomas' procesado en fresco y conservado bajo un flujo cíclico de 4 ppm O<sub>3</sub> también causó, tanto en tomate entero como procesado en fresco, un incremento en la tasa respiratoria y emisión de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, declinando gradualmente frente al continuo aumento en la tasa respiratoria del testigo en aire (Aguayo et al., 2005). Coincidiendo con estos resultados, Jin et al. (1989) reportaron que la senescencia de tomates y mandarinas se retrasaba con la exposición a O<sub>3</sub> debido a una menor intensidad respiratoria y emisión de etileno. Cebollas y patatas tratadas con 0,2 µg·L<sup>-1</sup> O<sub>3</sub> durante 8 horas al día y durante 5 días a la semana disminuyeron la absorción de O<sub>2</sub> y la actividad catalasa.

Por el contrario, Liew y Prange (1994) obtuvieron un ligero aumento en la tasa respiratoria bajo O<sub>3</sub> aunque dependió de la temperatura, reflejando una expresión anormal del metabolismo. Kuprianoff (1953) advirtió que el incremento en la respiración de manzanas sucedía sólo con altas concentraciones de O<sub>3</sub> (25 a 90 ppm). Sin embargo, Kolodyaznaya y Suponina (1975)

tan sólo observaron ligeras variaciones en la intensidad respiratoria de patatas conservadas con 4 a 9 ppm O<sub>3</sub>. Gane (1936) encontró que la exposición de plátanos maduros a 1,5 a 7 ppm O<sub>3</sub> no variaba la tasa respiratoria y fue efectiva para retrasar la maduración, pero sólo si la fruta no estaba próxima a la maduración. La tasa respiratoria y emisión de etileno en melocotones "O'Henry" no se vio afectada por la exposición al O<sub>3</sub> (Palou et al., 2002).

#### Calidad sensorial y nutritiva

La aplicación de O<sub>3</sub> influye en la calidad sensorial y nutritiva de los productos conservados en un ambiente ozonizado. Distintos autores han encontrado mejoras o desventajas como pasamos a comentar.

Cuando los tomates se maduraron en 3,7 ppm O<sub>3</sub> poseían un pronunciado y típico aroma en comparación con los conservados en aire a 20°C (Maguire et al. 1980). En esta misma línea, Ewell (1950) detectó un incremento en el aroma al tratar fresas con 2 a 3 ppm O<sub>3</sub> y Gottauf y Hansen (1965) observaron que la adición de O<sub>3</sub> en la cámara de conservación no eliminaba los componentes típicos del aroma de manzanas. Baranovskaya et al. (1979) ozonizó patatas, cebollas y remolacha azucarrera sin afectar a su composición química y sensorial. Sin embargo, en uva "Napoleón" conservada 43 días a 0°C la aplicación de choques de 8 ppm O<sub>3</sub> durante 30 min seguidos de 2,5 h de aireación mejoraron la calidad sensorial de las bayas frente al testigo en aire (Artés-Hernández et al., 2001).

También el O<sub>3</sub> puede eliminar sabores y aromas indeseables producidos por bacterias (Baranovskaya et al., 1979). Sin embargo, Aguayo (2003) mejoró la apariencia y calidad global de rodajas de tomate pero encontró que el aroma se perdió cuando se mantenían en una atmósfera ozonada (4 ppm). También, Pérez et al. (1999) observaron un 62% de menor contenido de volátiles en fresas ozonizadas pensando que el O<sub>3</sub> pueda tener un efecto irreversible en la capacidad de la fresa para producir volátiles aunque opinaron que la supresión temporal de la emisión de volátiles estaba normalmente asociada con condiciones postcosecha que retrasan la madurez (Fallik et al., 1997).

Otros beneficios los encontró Bazarova (1982), al conservar manzanas a 0°C y 90-95% HR con 5-6 µg·L<sup>-1</sup> O<sub>3</sub> gas durante 4h al día, al reducir las pérdidas de peso y la incidencia de daños en el fruto. Kolodyaznaya y Suponina (1975) observaron que tras varios meses de conservación de patatas con 4 a 9 ppm O<sub>3</sub> mostraron mayor contenido en vit. C. También se observó un aumento en el contenido de ácido ascórbico y fumárico, acompañado de un menor consumo de glucosa y fructosa, tanto en tomate entero como mínimamente procesado en fresco (Aguayo et al., 2005). De igual forma Pérez et al. (1999) en fresa detectaron un mayor contenido en vit. C en los tratamientos de 0,35 ppm O<sub>3</sub> frente al testigo como encontraron Luwe et al. (1993) y Ranieri et al. (1996). Maguire et al. (1980) comprobaron la acumulación de licopeno en tomates rin (ripening-inhibited) conservados 9 días a 20°C bajo 3,7 ppm O<sub>3</sub>. Artés-Hernández et al. (2003) observaron en uvas Napoleón una concentración de 8 ppm de O<sub>3</sub> triplicaba el contenido de resveratrol. Sin embargo, Pérez et al. (1999) observaron una reducción en el contenido de antocianos de fresas. Kolodyaznaya y Suponina (1975) observaron que tras varios meses de conservación de patatas con 4 a 9 ppm O<sub>3</sub>, éstas mostraron entre un 3 y un 6% más de almidón y entre 1,3 y 1,5 veces menos en azúcares totales que el testigo.

Según Aguayo et al. (2005), el O<sub>3</sub> también puede retrasar el ablandamiento de tomates enteros (21% frente al 28% del testigo, después de 15 días de conservación). No obstante, Escriche et al. (2001) no observaron cambios en la textura, al tratar champiñones con 100 mg·h<sup>-1</sup> O<sub>3</sub> durante 15 ó 30 min antes del envasado.

## COMBINACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA AUMENTAR LA EFICACIA DEL OZONO

Los efectos antimicrobianos del O<sub>3</sub> pueden aumentar considerablemente cuando se combina con otros trata-

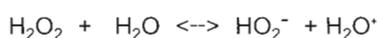
**TABLA 4**  
Efectos en la salud del ser humano tras la exposición a distintas concentraciones de O<sub>3</sub>

CONCENTRACIÓN DE O <sub>3</sub> µg/m <sup>3</sup>	EFFECTOS
30	Perceptible al olfato; sin embargo la habituación es muy rápida
70	Irritaciones iniciales de la conjuntiva ocular
100	Probabilidad de jaquecas
160	En animales se reduce la capacidad de resistencia a infecciones pulmonares bacterianas
160 a 200	Desinfección pulmonar, especialmente al hacer ejercicio
200	Aumento de la cantidad de leucocitos, inactivación del sistema de inmunidad
240 a 300	Mayor frecuencia de ataques de asma
240 a 700	Reducción de la fuerza física
400	Tos, dolor torácico. Después de exposición a 400µg/m <sup>3</sup> de O <sub>3</sub> tienen lugar cambios hormonales y enzimáticos 800 Reacción inflamatoria de los tejidos 1000 Después de 6-10 horas de exposición daños iniciales en los cromosomas humanos.
800	Reacción inflamatoria de los tejidos
1000	Después de 6-10 horas de exposición daños iniciales en los cromosomas humanos.

Fuente: Shirk (2000).

mientos químicos (ej: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o físicos (radiaciones UV) según Kim et al. (2003).

**Procesos de oxidación avanzada (AOPs):** son procesos diseñados para generar niveles altos de reactivos intermedios, principalmente el radical hidroxilo para tratamientos de compuestos orgánicos recalcitrantes en agua. Entre los procesos de oxidación avanzada se encuentra la ozonización a altos pH, procesos H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> y UV fotólisis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solución acuosa, parcialmente se disocia a anión hidropéroxido, el cual es altamente reactivo con O<sub>3</sub>.



Los iones hidropéroxidos consumidos por el O<sub>3</sub> son rápidamente reemplazados por el desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la derecha. Así que, una pequeña concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría ser efectiva para iniciar la descomposición del O<sub>3</sub> (Khadre et al., 2001).

**Ozono-cloro:** el O<sub>3</sub> parece tener una actividad que no tiene el Cl, al alterar la permeabilidad. Se ha comprobado que el Cl libre es bastante ineficaz contra los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* si está precedido por una pequeña dosis de O<sub>3</sub>. La preozonización altera la permeabilidad de las membranas del ooquiste, permitiendo la penetración del Cl libre y causando su inactivación

(Kim et al., 2003). Estos autores, investigaron la desinfección secuencial con O<sub>3</sub>, seguida de Cl libre, utilizando esporas de *Bacillus subtilis*. El estudio mostró que el efecto sinérgico en la inactivación de las esporas, parecía depender del nivel de preozonización. Cuando esta desinfección secuencial, se llevó a cabo en el orden inverso, no mejoró la desinfección, por lo que parece que el O<sub>3</sub> indujo la desestabilización de la superficie celular y la difusión del Cl libre fue mayor.

**Ozono – pulsos eléctricos (PE):** Unal y otros (2001), estudiaron la inactivación de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus leichmannii* por combinaciones de O<sub>3</sub> y pul-

tos eléctricos (PE). Las células se trataron con  $0,25 - 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \text{O}_3$  en una suspensión celular, PE de 10 a 30 kV/cm, o combinaciones de  $\text{O}_3$  y PE. En el tratamiento de *L. leichmannii* con PE (20 kV/cm), después de la exposición a 0,75 y  $1 \mu\text{g}/\text{mL} \text{O}_3$ , se inactivaron 7,1 y 7,2 unidades log, respectivamente. Sin embargo, con la aplicación individual de 0,75 y  $1 \mu\text{g}/\text{mL} \text{O}_3$ , se inactivaron 2,2 y 2,6 log ufc  $\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente y con PE de 20 kV/cm se inactivó tan sólo 1,3 log ufc  $\cdot\text{mL}^{-1}$ . Al tratar *E. coli* y *L. monocytogenes* con  $\text{O}_3$  y PE simultáneamente se observó un efecto sinérgico (Khadre et al., 2001).

## DETERIORO DE LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS

El  $\text{O}_3$  no genera un beneficio universal durante la conservación de los alimentos. Kuprianoff (1953) señaló que era de esperar que este gas afectara al metabolismo de los organismos vivos como las frutas y hortalizas. Sin embargo, no es fácilmente detectable el efecto que causa en las mismas ya que en la mayoría de las frutas, no puede penetrar con profundidad por falta de permeabilidad de la piel y porque la superficie de la fruta, contiene pocos materiales fácilmente oxidables. Sin embargo, la sensibilidad de las frutas u hortalizas varía de acuerdo al tipo de producto e incluso depende de la especie. Por ejemplo, en arándanos, la delgada piel de la fruta reacciona con el  $\text{O}_3$  permitiendo que éste penetre rápidamente, oxidando, e incluso llegando a dañar el fruto (Norton et al. 1968; Rice et al., 1982). El  $\text{O}_3$  puede oxidar compuestos orgánicos, particularmente aquellos con anillos fenólicos o enlaces insaturados en su estructura (Razumovski y Zaikov, 1984) y tiene un efecto negativo en la calidad sensorial de cereales debido a la oxidación lipídica.

Por lo tanto, las alteraciones en los atributos sensoriales dependen de la composición química del alimento, dosis de  $\text{O}_3$  y condiciones del tratamiento (Kim et al., 1999a). Además,

puede cambiar el color superficial de melocotones, zanahorias (Liew y Prange 1994) y brócoli (Zhuang et al., 1996). Estos autores incluso demostraron que el  $\text{O}_3$  disminuyó el contenido en ácido ascórbico en brócoli.

## TOXICIDAD

El  $\text{O}_3$  es altamente corrosivo y letal para los humanos a concentraciones superiores a 4 ppm. Es ya detectable por su olor a concentraciones de 0,04 ppm. La toxicidad del  $\text{O}_3$  es el criterio más importante para aprobar su uso en plantas de procesamiento de alimentos. Es importante supervisar a los trabajadores de las industrias que pueden estar en contacto con el  $\text{O}_3$ . Los límites de exposición para un trabajador son de 0,1 ppm durante un periodo máximo de 8 horas y 0,3 ppm durante 15 min para la "Occupational Safety and Health Administration de EEUU". El  $\text{O}_3$  no está considerado como cancerígeno o mutagénico y no se acumula en los tejidos grasos (Pryor, 1998). Entre los síntomas de toxicidad del  $\text{O}_3$  en el ser humano, afecta a las vías respiratorias, provoca tos, dolores de cabeza, mareos e irritación en los ojos y garganta, con un sabor y olor acentuado. Los síntomas de toxicidad crónica, pueden causar dolores de cabeza, debilitamiento, pérdida de memoria, aumento de persistencia de bronquitis y una excitabilidad muscular creciente (Tabla 4).

El Real Decreto 1796/2003 establece los valores de concentraciones de  $\text{O}_3$  para proteger tanto la salud de las personas como la vegetación.

## CONCLUSIÓN

El  $\text{O}_3$  es un gas con gran aptitud para su uso en la industria agroalimentaria. Su empleo, en lavados ozonizados o en cámaras de conservación, permite reducir el crecimiento microbiano, y puede llegar a mejorar la calidad sensorial y nutritiva del producto. En algunas frutas puede afectar a la actividad metabólica, incrementando la emisión de  $\text{CO}_2$  y  $\text{C}_2\text{H}_4$ , aunque durante un corto periodo de tiempo, para posteriormente

ser superadas por el testigo, permitiendo prolongar la vida útil de los productos ozonizados. El  $\text{O}_3$  es un potente oxidante y antimicrobiano que no deja residuos, de amplio espectro, activo contra bacterias gram-negativas y gram-positivas, hongos, virus, protozoos y esporas bacterianas y fúngicas. Su eficiencia depende de las condiciones del medio (temperatura, HR, pH, cantidad y tipo de materia orgánica), dosis y método de aplicación. Dado que su acción antimicrobiana tiene lugar principalmente en la superficie, la morfología del producto a tratar es otro parámetro fundamental a considerar. A pesar de sus múltiples ventajas, los beneficios que aporta no son universales por lo que deben continuar los estudios para averiguar las potencialidades de su empleo en la industria agroalimentaria. 

## Bibliografía

- 1.- Achen, M., 2000. Efficacy of ozone in inactivating *Escherichia coli* O157:H7 in pure cell suspensions and on apples. M.S. Thesis. The Ohio State University, Columbus.
- 2.- Adler, M.G., Hill, G.R. 1950. The kinetics and mechanism of hydroxide iron catalyzed ozone decomposition in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc. 72, 1884-1886.
- 3.- Aguayo, E., 2003. Innovaciones Tecnológicas en la conservación de tomate y melón procesado en fresco. Phd Thesis. Universidad Politécnica de Cartagena, 386 p.
- 4.- Aguayo, E., Escalona, V.H., Artés, F. 2005. Effect of the cyclic exposure to ozone gas on phytochemical, sensorial and microbial quality in whole and sliced. Enviado.
- 5.- Ameur, M. 2004. Eficacia del agua ozonizada o clorada en la calidad de la escalora procesada en fresco. Trabajo de Fin de Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena, 130 p.
- 6.- Artés, F. 2004. Refrigeration for preserving the quality and enhancing the safety of plant foods. Bulletin International Institute of Refrigeration. LXXXIV, 1: 5-25.
- 7.- Artés-Hernández F., Artés F., Tomás-Barberán F.A. 2003. Quality and enhancement of bioactive phenolics in Cv. Napoleon table grapes exposed to different postharvest gaseous treatments. J. Agricul. Food Chemistry. 51 (18): 5290-5295.
- 8.- Artés-Hernández, F., Pagán, E.M., Artés, F. 2001. Efecto del ozono para preservar la calidad de la uva de mesa tardía refrigerada. I Congreso Nacional Tecnología Alimentos. Granada.

- 9.- Avena-Bustillos, R.J., Pacheco-Cázar, G., Campos-Sauceda, J.P., Montoya-Araujo, M.B. y Cano, D.C. 2002. Effect of ozone on tomatoes washing. IFT Annual Meeting, Anaheim, California. Poster 65A-2.
- 10.- Bablon, G., Belamy, W.D., Billen, G., Bourbigot, M.M., Daniel, F.B., Erb, F., Gomella, C., Gordon, G., Hartemann, P., Joret, J.C., Knocke, W.R., Langlais, B., Laplanche, A., Legube, B., Lykins, Jr B., Martin, G., Martin, N., Montiel, A., Morin, M.F., Milner, R.S., Perrine, D., Prevost, M., Reckhow, D.A., Servais, P., Singer, P.C., Sproul, O.T., Ventresque, C. 1991. Practical applications of ozone: Principles and case studies. En: Langlais, G., Reckhow, D.A., Brink, D.R., (ed.). Ozone in water treatment: Application and engineering. Chelsea, Mich., USA, Lewis Publisher, Inc., 133-316.
- 11.- Bader, H. Hoigne, J. 1981. Determination of ozone in water by indigo method. *Water Res.* 15, 449-456.
- 12.- Baranovskaya, V.A., Zapolskii, O.B., Ovrukskaya, I.Y., Obodovskaya, N.N., Pshchenichnaya, E.E., Yushkevich, O.I., 1979. Use of ozone gas sterilization during storage of potatoes and vegetables. *Konservn. Ovoshchesu Promst* 4, 10-12.
- 13.- Barth, M.M., Zhou, C., Mercier, M., Payne, F.A., 1995. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *J. Food Sci.* 60, 1286-1287.
- 14.- Beltrán, F.J. 1995. Theoretical aspects of the kinetics of competitive ozone reactions in water. *Ozone Science and Engineering*, 17, 163-181.
- 15.- Beltrán, D., Periago, P.M., Gil, M.I. 2003. El ozono como higienizante de productos vegetales frescos cortados. II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Junio, 769-722.
- 16.- Bott, T.R. 1991. Ozone as a disinfecting in a process plant. *Food Control*, 2, (1), 44-49.
- 17.- Broadwater, W.T., Hoehn, R.C., King, P.H. 1973. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl. Microbiol.*, 26, 391-393.
- 18.- Burleson, G.R., Murray, T.M. y Pollard, M. 1975. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Microbiol.*, 29, 340-344.
- 19.- Cena, A. 1998. Ozone: Keep it fresh for processing. *Water Conditioning Purification*, 9, 112-115.
- 20.- Chang, C.Y. y Chiu, C.Y. (1996). Combined self-absorption and self-decomposition of ozone in aqueous solutions with interfacial resistance. *Ozone Science and Engineering*, 18, 183-194.
- 21.- Cherry, J.P. 1999. Improving the safety of fresh produce with antimicrobials. *Food Technol.*, 53, 54-59.
- 22.- Elford, W.J., Ende, V.D. 1942. An investigation of the merits of ozone as an aerial disinfectant. *J. Hyg.*, 42, 240-265.
- 23.- Escriche, I., Serra, J.A., Gómez, M., Galotto, M.J., 2001. Effect of ozone treatment and storage temperature on physicochemical properties of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Sci. Tech. Int.* 7,3,251-258
- 24.- Ewell, A.W., 1950. Ozone and its applications in food preservation. *Am. Soc. Refrigerating Engrs., Refrigerating Engrg. Applic., Sept.*
- 25.- Fallik, E., Archbold, D.D., Hamilton-Kemp, T.R., Loughrin, J.H. y Collins, R.W. 1997. Heat treatment temporarily inhibits aroma volatile compound emission from Golden Delicious apples. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4038-4041.
- 26.- Farooq, S., Akhlaque, S. 1983. Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation. *Water Res.*, 17, 809-812.
- 27.- Foegeding, P.M. 1985. Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and the importance of the spore coat to resistance. *Food Microbiol.*, 2, 123-134.
- 28.- Gane, R., 1936. The respiration of bananas in presence of ethylene. *New Phytologist*, 36, 170-178.
- 29.- Garcia, A., Mount, J.R., Davidson, P.M., Yoder, R.E. 2001. Effectiveness of ozone and/or chlorine treatments on extending shelf life of fresh-cut lettuce salads. Resumen 30B. IFT Annual Meeting, New Orleans, Louisiana. Poster 30B-28.
- 30.- Giese, A.C., Christenser, E. 1954. Effects of ozone on organisms. *Physiol. Zool.* 27, 101-115.
- 31.- Glaze, W.H., Kang, J.W. 1989. Advanced oxidation processes. Description of a kinetic model for the oxidation of hazardous materials in aqueous media with ozone and hydrogen peroxide in a semibatch reactor. *Indl. Engr. Chem. Research*, 28, 1573-1580.
- 32.- Gordon, G., Grunwell, J. 1983. Comparison of analytical methods for residual ozone. Proc. 2nd Natl. Symposium on municipal wastewater disinfection. EPA Report, EPA 600/9-83-009.
- 33.- Gottauf, M., Hanse, H. 1965. On the action of ozone in the storage atmosphere of apples-gas chromatographic studies. *Kaltetechnik*, 17 (10), 315-316.
- 34.- Graham, D.M., 1997. Use of ozone for food processing. *Food Technol.* 51, 6, 72-75.
- 35.- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C., 2004a. Use of ozone in the food industry. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, 453-460.
- 36.- Guzel-Seydim, Z.B., Rever, P.I., Greene, A.K. 2004b. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food microbiology*, 21, 475 – 479.
- 37.- Hampson, B.C., Fiori, S. 1997. Application in food processing operations. En: Proc. IOAPAG Animal Conf., Lake Tahoe, Nev. Stamford, Conn.: Int Ozone Assoc., Pan American Group, 261-267. Cit
- 38.- Harakeh, M.S., Butler, M. 1985. Factors influencing the ozone inactivation of enteric viruses in effluent. *Ozone Sic. Eng.*, 6, 235-243.
- 39.- Heagle, A.S. 1989. Ozone and crop yield. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27, 397 – 423.
- 40.- Heagle, A.S., Strickland, A. 1972. Reaction of *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei* to low levels of ozone. *Phytopath.*, 62, 1144-1148.
- 41.- Hibben, C.R., Stotzky, G. 1969. Effects of oxone on the germination of fungus spores. *J. Microbiol.*, 15, 1187-1196.
- 42.- Horvath, M., Bilitzky, L., Hutner, J. 1985. *Ozone*. New York: Elsevier. 350 p.
- 43.- Hunt, N.K., Marinas, B.J. 1997. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone water. *Water Res.*, 31, 1355-1362.
- 44.- Ingram, M., Barnes, E.M. 1954. Sterilization by means of ozone. *J. Appl. Bacteriol.*, 17, 246-271.
- 45.- Ishizaki, K., Shinriki, N., Ikehata, A., Ueda, T. 1981. Degradation of nucleic acids with ozone. Degradation of nucleobases, ribonucleosides and ribonucleoside-5-monophosphates. *Chem. Pharm.*, 29, 868-872.
- 46.- Jin, L., Xiaoyu, W., Honglin, Y., Zonggan, Y., Jiayun, W., Yaguang, L., 1989. Influence of discharge products on post-harvest physiology of fruit. Proc. 6th Int. Symp. High Voltage Eng., 28 August-1 September. New Orleans, LA, 4.
- 47.- Kaess, G., Weidemann, J.F. 1968. Ozone treatment of chilled beef. Effect of low concentrations of ozone on microbial spoilage and surface color beef. *J. Food Technol.*, 3, 325-334.
- 48.- Kangasjarvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., Karjalainen, R. 1994. Plant defense systems induced by ozone. *Plant Cell Envir.* 17, 783-794.
- 49.- Katzenelson, E., Kletter, B., Shuval, H.F. 1974. Inactivation kinetics of viruses and bacteria in water by use of ozone. *J. Am. Water Works Assoc.*, 66, 725-729.
- 50.- Kawamura, K., Kaneko, M., Hirata, T. y Taguchi, K. 1986. Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes. *Water Sci. Technol.*, 18, 175-184.
- 51.- Kim, C.K., Gentile, D.M., Sproul, O.J. 1980. Mechanism of ozone inactivation of bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 210-218.
- 52.- Kim, J.G., Yousef, A.E. 2000. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *J. Food Sci.*, 65, 521-528.
- 53.- Kim, J.G., Yousef, A.E., Chism, G.W. 1999a. Use of ozone to inactivate microorganism on lettuce. *J. Food Safety*, 19, 17-34.
- 54.- Kim, J.G., Yousef, A.E., Dave, S., 1999b. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of food: a review. *J. Food Protect.* 6: 1071-1087.

- 55.- Kim, J.G., Yousef, A.E., Khader M.A. 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 167 – 218.
- 56.- Kinman, R.N. 1975. Water and wastewater disinfection with ozone: A critical review. *Crit. Rev. Environ. Contr.*, 5, 141-152.
- 57.- Kolodyaznaya, V.S., Suponina, T.A. 1975. Storage of foods using ozone. *Kholodil'naya Tekhnika* 6, 39-41.
- 58.- Komanapalli, I.R., Lau, B.H.S. 1996. Ozone-induced damage of *Escheria coli* K-12. *Appl. Environ. Biotechnol.*, 46, 610-614.
- 59.- Krade, M.A., Yousef, A.E. 2001. Sporidial action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 131-138.
- 60.- Krade, M.A., Yousef, A.E., Kim, J.G. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J. Food Sci.*, 66, 9, 1242-1252.
- 61.- Krause, C.R., Weidensaul, T.C., 1977. Effects of ozone on the sporulation, germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 68, 195-198.
- 62.- Kuprianoff, J. 1953. The use of ozone in cold storage of fruit. *Z. Kaltetechnik*, 10. Citado por Rice et al. (1982).
- 63.- Langlais, B., Reckhow, D.A., Brink, D.R. 1991. Practical application of ozone: Principle and case study. En: *Ozone in water treatment*. Lewis Publishers. Chelsea. Mich.
- 64.- Lee, J.Y., Deniniger, R.A. 2000. Survival of bacteria after ozonation. *Ozone Sci. Eng.*, 22, 65-75.
- 65.- Leiguarda, R.H., Peso, O.A., Palazzolo, A.Z. 1949. Bactericidal action of ozone. *Water Pollut.*, resumen, 22, 268.
- 66.- Lewis, L., Zhuang, H., Payne, F.A., Barth, M.M. 1996. Betacarotene content and color assessment in ozone-treated broccoli florets during modified atmosphere packaging. *Institute of Food Technologists Annual Meeting*, libro de resúmenes, 99.
- 67.- L'Herauld, P., Chung, Y.S. 1984. Mutagenicity of ozone in different repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 197, 472-477.
- 68.- Liew, C.L., Prange, R.K. 1994. Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Caucus carota* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 563-567.
- 69.- Luwe, M.W.F., Takahama, U., Heber, U. 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.*, 101, 969-976.
- 70.- Maguirre, Y.P., Solverg, M., 1980. Influence of atmospheric oxygen and ozone on ripening indices of normal (Rin) and ripening inhibited (rin) tomato cultivars. *J. Food Biochem.* 4, 99-110.
- 71.- McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R.H., Miller, D.R., Rogers, T.D., Norred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R.D., Kubena, L.F., Phillips, T.D. 1997. Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 807-820.
- 72.- Morrell, J., Serra, J.A., Andueza, E. y Moreno, E. 1993. Tratamiento con ozono en conservas de champiñón como alternativa al uso sulfuroso. *Alimentación, equipos y tecnología*, 5, 62- 68.
- 73.- Mura, C., Chung, Y.S. 1990. In vitro transcription assay of ozonated T7 phage DNA. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16, 44-47.
- 74.- Murray, R.G., Pumela, S., Elson, H.E. 1965. The location of the mucopeptide of sections of the cell wall of *Escherichia coli* and other gram negative bacteria. *Can.*, *J. Microbiol.* 11, 3, 547-560.
- 75.- Nadas, A., Olmo, Martínez, M.C., García J.M., 2000. El ozono en la conservación de los cítricos. *Levante agrícola. Horticultura Internacional, especial postcosecha*, 251 – 258.
- 76.- Norton, J.S., Charing, A.J., Demoranville, I.E. 1968. The effect of oxone on storage of canberries. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 93, 792-796.
- 77.- Ogawa, J.M., Feliciano, A.J., Manji, B.T. 1990. Evaluation of ozone as a disinfectant in postharvest dump tank treatments for tomato. *Phytopathology*, 80, 1020-1026.
- 78.- Palou, L., Crisosto, C.H., Smilanick, J.L., Adaskaveg, J.E., Zoffoli, J.P. 2002. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 39-48.
- 79.- Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.W., Harris, L.J., Garret, E.H., Farber, J.N., Busta, F.F. 2003. Methods to reduce eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*. 161-173.
- 80.- Pérez, A.G., Sanz, C., Ríos, J.J., Ollas, R., Ollas, J.M. 1999. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1652-1656.
- 81.- Pryor, A. 1998. Ozone toxicology and guidelines for safe use in food processing ozonation systems. *EPRI Ozone workshop*, Memphis, May. Citado por Xu (1999).
- 82.- Ranieri, A., D'Urso, G., Nalli, C., Lorenzini, G., Soldatini, G.F. 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiol. Plant.*, 97, 381-387.
- 83.- Razumovski, S.D., Zaikov, G.E. 1984. Ozone and its reactions with organic compounds. *Elsevier*, NY.
- 84.- RD 1796/2003. Ozono en el aire ambiente. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, España 11: 1071-1081
- 85.- Rego, P., Vendrell, M.C., García, F.J., Gallardo, C.S., González, J.A., Gallego, A.R., Rodríguez, L.A. 2002. Estudio de la cinética de muerte con tratamientos de ozono a microorganismos patógenos típicos de hortalizas. *Alimentaria*, 3, 125-128.
- 86.- Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 9, 3471-3475.
- 87.- Rice, R.G., Farquhar, J.W., Bollyky, L.J. 1982. Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. *Ozone Sci. Eng.* 4, 147-163.
- 88.- Roy, D., Chian, E.S.K., Engelbrecht, R.S. 1981. Kinetics of enteroviral inactivation by ozone. *J. Environ. Eng.*, 107, 887.
- 89.- Saper, G.M. 1998. New technologies for safer produce: Chemical based treatments and decontamination by washing. En: *Proc. of fresh fruit and vegetables: Food safety challenges*, Chicago, Mayo, 12-14.
- 90.- Saring, P., Zahavi, T., Zutkhi, Y., Yannai, S., Lisker, N., Ben-Arie, R. 1996. Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48, 403-415.
- 91.- Schraudner, M., Langebartels, C., Sanderman, H. 1997. Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environment pollutant ozone. *Physiol. Plantarum*, 100: 274 – 280.
- 92.- Schultz, C.R., Bellamy, W.D. 2000. The role of mixing in ozone dissolution systems. *Ozone Sci. Eng.*, 22, 329-350.
- 93.- Scott, D.B.M. 1975. The effect of ozone on nucleic acids and their derivatives. En: *Blogoslawski, W.J., Rice, R.G. (ed.) Aquatic applications of ozone*. Syracuse, N.Y.: International Ozone Institute, 1.15.
- 94.- Scott, D.B.M., Leshner, E.C. 1963. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 85, 567-576.
- 95.- Shirk, O. (2000). *Las mediciones del ozono*. Dräger Sicherheitstechnik GmbH. Traducido y revisado por Raquel Morón Hodge. Dräger Hispania Mapfre Seguridad 77: 17 – 21.
- 96.- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Stroshine, R.L. 2002a. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *Food Microbiol.*, 19, 183-193.
- 97.- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Stroshine, R.L. 2002b. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensm. Wiss Technol.*, 35, 720-729.
- 98.- Skog, L.J., Chu, C.L. 2000. Ozone technology for shelf life extension of fruits and vegetables. *Proc. 4th Conf. On Postharvest*. Eds. Ben-Aire, R. y Philosoph-Hadas, S. Vol., II. *Acta Hort.*, 553, ISHS, 285-291.