



# Influence of aqueous ozonation on physicochemical properties and incidence of phytopathogens in minimally processed strawberries<sup>1</sup>

## *Influência da ozonização aquosa nas propriedades físico-químicas e incidência de fitopatógenos em morangos minimamente processados*

Caroline Corrêa de Souza Coelho<sup>2</sup>, Maristella Martineli<sup>3</sup>, Otniel Freitas-Silva<sup>4\*</sup>, Lourdes Maria Correa Cabral<sup>4</sup>

**Abstract:** Minimally processed strawberries are perishable and susceptible to the development of pathogenic agents, making their post-harvest life limited. Thus, sanitization is a crucial step to ensure the quality of this produce. The objective was to evaluate the effect of treatment with ozone gas dissolved in water on the physicochemical properties and the incidence of pathogens in minimally processed strawberries stored under refrigeration. After minimal processing, “Camino Real” strawberries were submitted to five different treatments: immersion in ozonated water (OW) at three different concentrations (0.2; 0.5; and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) at 10 °C for 5 min; chlorine sanitization (Sumaveg<sup>®</sup>) in two steps, at 150 mg L<sup>-1</sup> and 5 mg L<sup>-1</sup>, at 10 °C for 10 min. The control treatment corresponded to fruits without sanitation. After the treatments, the fruits were stored under refrigeration at 5 °C and 90% RH and evaluated for 12 days regarding postharvest quality (physical, physicochemical and biochemical), as well as the incidence of diseased fruits (%). The results showed that the sanitization of fruits with ozonated water, regardless of the concentration, favored the quality and health of strawberries during storage compared to fruits subjected to sanitization with chlorinated water and control fruits. Ozonated water treatment is an alternative to traditional sanitization with chlorine, maintaining the physicochemical quality of the minimally processed “Camino Real” strawberries stored under refrigeration.

**Key words:** Postharvest storage. Ozonation. Food safety. *Fragaria*. Antimicrobial. Postharvest processing. Qualitative changes. “Camino Real”.

**Resumo:** Morangos minimamente processados são perecíveis e susceptíveis ao desenvolvimento de agentes patogênicos, tornando sua vida pós-colheita limitada. Dessa forma, a sanitização é um passo crucial para garantir a qualidade desses produtos. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do gás ozônio dissolvido em água nas propriedades físico-químicas e na incidência de patógenos em morango minimamente processados e armazenados sob refrigeração. Após o processamento mínimo, morangos da variedade “Camino Real” foram submetidos a cinco tratamentos diferentes: imersão em água ozonizada (AO) em diferentes concentrações (0,2; 0,5; e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) a 10 °C durante 5 min; sanitização clorada (Sumaveg<sup>®</sup>), em duas etapas a 150 mg L<sup>-1</sup> e 5 mg L<sup>-1</sup>, a 10 °C durante 10 min. O tratamento controle corresponde aos frutos sem sanitização. Após os tratamentos, os frutos foram armazenados sob refrigeração a 5 °C e 90% UR e avaliados por 12 dias, quanto a qualidade pós-colheita (física, físico-química e bioquímicas, bem como a incidência de frutos doentes (%)). Os resultados mostram que a sanitização dos frutos com água ozonizada, independente da concentração, favoreceu a qualidade e sanidade dos morangos, durante o armazenamento, quando comparados aos frutos submetidos a sanitização com água clorada e frutos controle. A água ozonizada é uma alternativa a sanitização tradicional, com cloro, mantendo a qualidade físico-química do morango minimamente processados “Camino Real” e armazenados sob refrigeração.

**Palavras-chave:** Armazenamento pós-colheita. Ozonização. Segurança alimentar. *Fragaria*; Antimicrobiano. Processamento pós-colheita. Alterações qualitativas. “Camino Real”.

\*Corresponding author

Submitted for publication on 20/10/2022, approved on 25/11/2022 and published on 29/12/2022

<sup>1</sup>Influence of aqueous ozonation on physicochemical properties and incidence of phytopathogens in minimally processed strawberries.

<sup>2</sup>Graduate Program in Food and Nutrition - PPGAN / UNIRIO, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: caroline.coelho@unirio.br;

<sup>3</sup>State University of Montes Claros, UNIMONTES, Janaúba Campus, MG, Brazil. E-mail: maristella.martineli@unimontes.br

<sup>4</sup>Embrapa Agroindústria de Alimentos, Brazilian Agricultural Research Corporation. Av Das Américas, 29501, 23020-470, Rio de Janeiro, Brazil. E-mails: otniel.freitas@embrapa.br; lourdes.cabral@embrapa.br

## INTRODUCTION

The strawberry (*Fragaria ananassa*) is one of the most popular fruits in the world due to its attractive flavor, color and aroma, high nutritional value, and various possibilities for industrial processing. However, the fruit is very perishable, with a high respiratory rate and susceptibility to the development of pathogenic agents, limiting its postharvest life (REIS *et al.*, 2008). Therefore, maintaining the freshness of the fruit after harvesting is a demanding task.

The demand for minimally processed fruits and vegetables (MPFVs) has grown throughout the world, since they are healthy and ready-to-eat foods, offer smaller portion options suitable for individual consumption and contain fewer byproducts (peel, inedible parts, etc.) (PINHEIRO *et al.*, 2005; MENDOZA *et al.*, 2022). A MPFV is defined as any fruit or vegetable that is cleaned, processed (peeled, cut, minced, grated or ground), dried, packaged and stored under refrigeration or frozen, to obtain convenient and practical products for sale and consumption, with fresh appearance, preserved sensory attributes and longer shelf life (FARDET, 2018; TROYO; ACEDO JR., 2019; MENDOZA *et al.*, 2022; SRIPONG *et al.*, 2022).

Fruits and vegetables are susceptible to food contamination and cross-contamination at various stages of the supply chain, from growing, harvesting, distribution, processing and handling. When performed improperly, these factors can lead to an increase in the microbiota and possibly include new pathogenic microorganisms. In addition, the presence of microorganisms and the release of their toxic compounds in fruits and vegetables can cause changes in the physiological and chemical properties of these products and even food poisoning outbreaks (YEOH *et al.*, 2014).

Thus, sanitization is a crucial step to ensure microbiological quality through significant reduction of pathogenic agents in MPFVs (MENDOZA *et al.*, 2022). However, in addition to high microbiological efficacy, the sanitizing agent needs to be safe for consumers from a toxicological viewpoint (COELHO *et al.*, 2015).

## INTRODUÇÃO

O morango (*Fragaria ananassa*) é uma das frutas mais populares do mundo devido ao seu sabor, cor e aroma atraentes, alto valor nutricional, além de diversas possibilidades de processamento industrial. No entanto, a fruta é muito perecível, com elevada taxa respiratória e susceptibilidade ao desenvolvimento de agentes patogênicos, limitando a sua vida pós-colheita (REIS *et al.*, 2008). Por conseguinte, manter o aspecto fresco da fruta após a colheita, ao longo do armazenamento, é uma tarefa exigente.

A procura por frutas e vegetais minimamente processados (FVMPs) tem crescido em todo o mundo, por ser um alimento saudável e pronto para o consumo, apresentar opções de porções menores adequadas ao consumo individual e pela ausência de subprodutos a nível do consumidor (casca, partes não comestíveis etc.) (PINHEIRO *et al.*, 2005; MENDOZA *et al.*, 2022). Assim, as FVMPs são definidas como qualquer fruta ou vegetal que antes de serem destinadas ao consumo são: higienizadas, processadas (descascadas, cortadas, picadas, raladas ou moída), secas, embaladas e armazenadas sob refrigeração ou congeladas, para obtenção de produtos convenientes e práticos na hora de comprar e consumir, com aspecto fresco, atributos sensoriais preservados e maior vida útil (FARDET, 2018; TROYO; ACEDO JR., 2019; MENDOZA *et al.*, 2022; SRIPONG *et al.*, 2022).

As frutas e vegetais são susceptíveis à contaminação e contaminação cruzada de alimentos em várias fases da cadeia de abastecimento, desde a produção, colheita, distribuição, processamento e manuseio inadequado. O manuseio, em várias etapas de processamento, pode levar a um aumento da microbiota e possivelmente incluir novos microrganismos patogênicos. Além disso, a presença de microrganismos e liberação de seus compostos tóxicos em frutas e vegetais pode causar alteração das propriedades fisiológicas e químicas desses produtos e até mesmo a surtos alimentares (YEOH *et al.*, 2014).

Dessa forma, a sanitização torna-se uma etapa crucial para assegurar a qualidade microbiológica, garantindo a redução significativa de agentes patogênicos nas FVMPs (MENDOZA *et al.*, 2022). No entanto, além de uma elevada eficácia microbiológica, o agente sanitizante precisa ser seguro para os consumidores do ponto de vista toxicológico (COELHO *et al.*, 2015).

The sanitization process at the industrial level is usually carried out with chlorinated compounds, since they are relatively easy to apply, inexpensive and have a wide spectrum of microbicidal activity (FREITAS-SILVA *et al.*, 2013). However, since 1975, the use of chlorinated compounds has been increasingly restricted due to the formation of highly toxic and carcinogenic byproducts, such as organochlorines, trihalomethanes (THMs) and haloacetic acids, when applied to organic materials (YEOH *et al.*, 2014).

Due to these factors and the possibility of environmental and occupational contamination, efforts to find alternative sanitizers to chlorine and other chemical disinfectants have grown. Ozone is an effective sanitizer with a broad spectrum of antimicrobial action along with disinfection and removal of pesticides, mycotoxins and other contaminants from fruits and vegetables.

In addition to being a powerful oxidant used in water treatment and surface decontamination, it is considered to be “Generally Recognized as Safe” (GRAS) for being nontoxic to consumers. Another advantage is the possibility of being generated at the place of use, without the need for transport and storage, reducing processing costs. Its application has been studied in gaseous and aqueous treatments (FREITAS-SILVA *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2018; ASLAM *et al.*, 2021).

Although strawberry is one of the most important cultivated fruit species worldwide, few investigations have been published on sanitization with aqueous ozone of minimally processed strawberries and its possible effects on quality attributes during storage. Therefore, the objective of this work was to evaluate the use of aqueous ozone as a postharvest sanitizer, in different concentrations, and the possible effects on the physical-chemical properties and incidence of pathogens in strawberries “Camino Real” minimally processed and stored under refrigeration.

O processo de sanitização nas indústrias é geralmente realizado com compostos clorados, uma vez que são relativamente fáceis de aplicar, de baixo custo e têm um largo espectro de atividade microbicida (FREITAS-SILVA *et al.*, 2013). Contudo, desde 1975, a utilização de compostos clorados tem sofrido restrições crescentes devido à formação de subprodutos altamente tóxicos e cancerígenos, tais como organoclorados, trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos, quando aplicados em materiais orgânicos (YEOH *et al.*, 2014).

Devido a esses fatores e à possibilidade de contaminação ambiental e ocupacional, os esforços para encontrar sanitizantes alternativos ao cloro e outros desinfetantes químicos tem crescido. O ozônio surge como um sanitizante eficaz com um amplo espectro de ação antimicrobiano, atua na desinfecção e remoção de pesticidas, micotoxinas e outros contaminantes de frutas e vegetais.

Além de ser um poderoso oxidante utilizado no tratamento da água e descontaminação de superfícies, é considerado um produto “Geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) por ser atóxico para os consumidores. Apresenta possibilidade de ser gerado no local de utilização, sem necessidade de transporte e armazenamento, reduzindo os custos de processo. Sua aplicação tem sido estudada em tratamentos gasosos ou aquosos (FREITAS-SILVA *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2018; ASLAM *et al.*, 2021).

Embora o morango represente uma das mais importantes espécies cultivadas mundialmente, poucas são as investigações sobre a sanitização com ozônio aquoso em morangos minimamente processados e seus possíveis efeitos nos atributos de qualidade ao longo do armazenamento. Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a utilização do ozônio aquoso como sanitizante pós-colheita, em diferentes concentrações, e possíveis efeitos nas propriedades físico-químicas e a incidência de patógenos em morangos, cultivar caminho real, minimamente processados e armazenados sob refrigeração.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Strawberries (*Fragaria × ananassa*, “Camino Real”) at the commercial maturity stage (¾ surface bright red) were obtained from a farm located in the municipality of Nova Friburgo, state of Rio de Janeiro, Brazil. The fruits were transported under refrigeration to the Embrapa Agroindústria de Alimentos in the city of Rio de Janeiro and stored in a refrigerated chamber at 5 °C and 95% relative humidity (RH). The fruits were submitted to visual selection to homogenize the lots regarding size, color and health by discarding fruits with injuries, deformations and signs of infection by pathogens.

### Experimental Design

The experimental design was completely randomized, with five treatments. The treatments consisted of two types of sanitization (ozone and chlorine) and a control treatment. For sanitization with ozone, three concentrations (0.2; 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) were studied, while chlorine was used at a concentration of 150 mg L<sup>-1</sup> of free chlorine. The Control treatment consisted of using distilled water to sanitize the fruits. The total number of evaluated fruits was 1,255, distributed in five lots of 251 fruits. The number of repetitions varied with the variables studied, as well as the experimental units.

### Sample preparation

Strawberries were subjected to minimal processing under refrigerated conditions (15 ± 3 °C) and adequate hygiene. The countertops and utensils used were previously washed with dichloro-s-triazinetriene dihydrate (Sumaveg<sup>®</sup>) at a concentration of 200 mg L<sup>-1</sup> of free chlorine. Initially, the fruits were washed under running water to remove dirt, and then cut with a stainless steel knife to remove the sepal and pedicel. After processing, the five lots received the treatments. For sanitation with aqueous ozone, ozone gas was dissolved in water at 10 °C at three concentrations: 0.2; 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Morangos (*Fragaria × ananassa*, cv. Camino Real) no estágio de maturação comercial (¾ da superfície vermelho brilhante) foram obtidos de uma fazenda localizada na cidade de Nova Friburgo, estado do Rio de Janeiro, Brasil. As frutas foram transportadas sob refrigeração para a Embrapa Tecnologia de Alimentos na cidade do Rio de Janeiro e armazenadas em câmara de refrigeração a 5 °C e 95% de umidade relativa (UR). As frutas foram submetidas à seleção visual para homogeneizar os lotes quanto ao tamanho, cor e descarte de frutas com lesões, deformações e sinais de infecção por patógenos.

### Delineamento Experimental

O delineamento experimento foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos. Os tratamentos consistiram em dois tipos de sanitização (Ozônio e Cloro) e um tratamento controle. Para a sanitização com ozônio, foram estudadas três concentrações (0,2; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>). Para o cloro foi empregada a concentração de 150 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre. O tratamento controle consistiu no uso de água destilada para sanitização das frutas. O total de frutos avaliados foram 1255, distribuídos em 5 lotes de 251 frutos. O número de repetição variou com as variáveis estudadas, bem como as unidades experimentais.

### Preparação das amostras

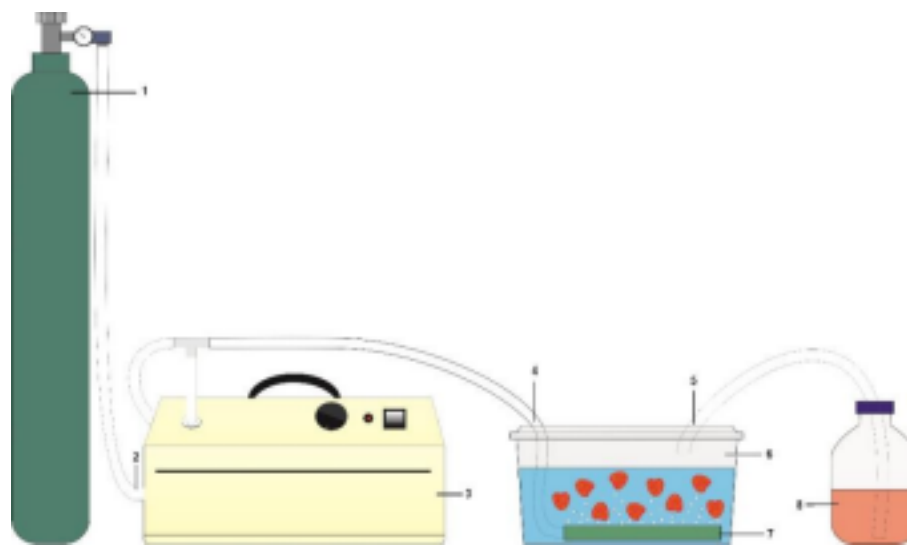
Os morangos foram submetidos ao processamento mínimo sob condições refrigeradas (15 ± 3 °C) e higiênicas adequadas. As bancadas e utensílios utilizados foram previamente lavados com detergente neutro e higienizados com uma solução de cloro (3% Dicloro-s-triazinetriena di-hidratada - Sumaveg<sup>®</sup>) a uma concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> de cloro livre. Inicialmente, as frutas foram lavadas sob água corrente para remoção das sujidades, em seguidas cortadas com faca de aço inoxidável para remover a sépala e o pedicelo. Após o processamento os cinco lotes receberam os tratamentos. Para a sanitização com ozônio aquoso, o gás ozônio foi dissolvido em água a 10 °C em três concentrações de ozônio (OZ): 0,2; 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

Sanitization of minimally processed strawberries with chlorine consisted of immersion in chlorinated solution (Sumaveg® 3%) at 10 °C, in a concentration of 150 mg L<sup>-1</sup> for 10 min, followed by rinsing at 5 mg L<sup>-1</sup> for another 10 min. The Control treatment consisted of immersion of fruits for 5 min in distilled water at 10 °C.

The sanitization with ozonated water used the system represented in Figure 1. The ozonation was carried out in a hermetically sealed polyethylene tank with rubber joints, for 5 minutes (Figure 1.6). Each tank had holes with silicone hoses for entry (Figure 1.4) and output (Figure 1.5) of O<sub>3</sub>. Ozonation was performed using ozone gas bubbling in distilled water, at 5 °C, through a porous diffuser affixed to the bottom of the tank (Figure 1.7). For this, an O<sub>3</sub> generator with electrical discharge in oxygen was used (Ozone & Life®, São Paulo, Brazil) (Figure 1.3).

A sanitização dos morangos minimamente processados com cloro consistiu na imersão em solução clorada (Sumaveg® 3%) a 10 °C, em concentração de 150 mg L<sup>-1</sup> por 10 min, seguido de enxágue a 5 mg L<sup>-1</sup> por mais 10 min. O tratamento controle consistiu em imersão dos morangos minimamente processados por 5 min em água destilada a 10 °C.

Os morangos minimamente processados e sanitizados em água ozonizada empregou o sistema representado na Figura 1. A ozonização dos morangos minimamente processados foi realizada em tanque de polietileno hermeticamente selado com borracha nas juntas, por 5 minutos (Figura 1.6). Cada tanque possui orifícios com mangueiras de silicone para a entrada (Figura 1.4) e saída (Figura 1.5) do O<sub>3</sub>. A ozonização foi realizada através de gás ozônio borbulhante em água destilada, a 5 °C, por difusor poroso afixado no fundo de um tanque (Figura 1.7). Para isto, foi utilizado o gerador de O<sub>3</sub> com descarga elétrica em oxigênio (Ozone & Life®, São Paulo, Brasil) (Figura 1.3).



**Figure 1** - Ozonation system: 1. Ultrapure oxygen cylinder; 2. Connection to oxygen cylinder; 3. Ozone generator; 4. Inlet hose for ozone gas; 5. Gas outlet hose; 6. Polyethylene tank; 7. Porous diffuser; 8. Potassium iodide solution.

**Figura 1** - Sistema de ozonização: 1. Cilindro de oxigênio ultrapuro; 2. Conexão ao cilindro de oxigênio; 3. Gerador de ozônio; 4. Mangueira de entrada para gás ozônio; 5. Mangueira de exaustão; 6. Tanque de polietileno; 7. Difusor poroso; 8. Solução de iodeto de potássio.

The residual concentration of ozone in the water, before immersion of the fruits, was measured with the K-7423 photometric analytical kit together with an I-2019 single-analyte photometer (SAM), both from Precision Labs. In the reaction, iodide ions are oxidized through the action of O<sub>3</sub> in the solution of potassium iodide. After the treatments, the minimally processed strawberries were drained into expanded polystyrene trays at 12 °C and 90% RH, for ± 40 min, until completely dry. Then they were packed in polypropylene trays with perforated lid and stored under refrigeration at 5 ± 2 °C and 90% RH. The physical, physicochemical and biochemical properties of the strawberries were evaluated every 3 days up to 12 days.

### Loss of mass, pulp firmness and fruit color

Fruit mass was evaluated on an analytical scale (0.01 g) on the date of storage and throughout the storage period, determining the percentage of lost mass. The maximum force for rupture of the strawberry epidermis was determined by puncture, using a benchtop penetrometer (TA.XT Plus Texture Analyzer) and expressed in Newtons (N). A 2 mm diameter metallic probe was used to penetrate the fruit pulp at two points on opposite sides. Color was determined with a digital colorimeter (Minolta CR-400), in a three-dimensional system of 'L\*' (light/dark), 'a\*' (red/green), and 'b\*' (yellow blue). The results were also expressed by the hue angle (angle of color intensity). Readings were taken at two opposite points of each fruit.

For fruit mass, three replicates were used and the experimental unit consisted of a tray containing 8 strawberries, totaling 24 fruits per treatment at each monitored storage interval (day). To evaluate the physical characteristics of color and firmness, three repetitions and five fruits per repetition were used, totaling 15 fruits per treatment per day of analysis. Firmness and color were analyzed at opposite points of each fruit, totaling two readings per fruit and 30 readings per treatment, at each storage interval. Evaluation of the physical and physical-chemical parameters was carried out every three days for 12 days of refrigerated storage at 5 °C.

A concentração residual de ozônio na água, antes da imersão dos frutos, foi medida com o kit analítico fotométrico K-7423 junto com um fotômetro SAM Ozone I-2019, ambos da Precision Labs. Na reação, os íons iodetos são oxidados por meio da ação do O<sub>3</sub> na solução de iodeto de potássio. Após os tratamentos, os morangos minimamente processados foram drenados em bandejas de poliestireno expandido a 12 °C e 90% UR, durante ± 40 min, até ficarem completamente secos. Em seguida, embalados em bandejas de polipropileno com tampa perfurada e armazenadas sob refrigeração por 12 d a 5 ± 2 °C e 90% UR. As propriedades físicas, físico-químicas e bioquímicas dos frutos dos morangos minimamente processados foram avaliados a cada 3 dias até 12 dias.

### Perda de massa, firmeza da polpa e cor dos frutos

A massa dos frutos foi avaliada em balança analítica (0,01 g) na data do armazenamento e ao longo do período de armazenamento, determinando-se o percentual de massa perdida. A força máxima para ruptura da epiderme dos morangos foi determinada por punção, utilizando um penetrômetro de bancada (TA.XT Plus analisador de textura) e expressa em Newtons (N). Uma sonda metálica de 2 mm de diâmetro foi utilizada para penetrar a polpa da fruta em dois pontos em lados opostos. A cor foi determinada com colorímetro digital (Minolta CR-400, Japão), em um sistema tridimensional 'L\*' (claro/escuro), 'a\*' (vermelho/verde), e 'b\*' (amarelo/azul). Os resultados também foram expressos pelo ângulo de tonalidade (ângulo de intensidade de cor). As leituras foram realizadas em dois pontos opostos de cada fruta.

Para a massa dos frutos empregou-se três repetições e a unidade experimental foi composta por uma bandeja contendo 8 morangos, totalizando 24 frutos por tratamento em cada intervalo de tempo de armazenamento monitorado (dia). Para avaliação das características físicas de coloração e firmeza, empregou-se três repetições e cinco frutos por repetição, totalizando quinze frutos por tratamento por dia de análise. As medições de firmeza e coloração foram analisadas em pontos opostos de cada fruto, totalizando duas leituras por fruto e trinta leituras por tratamento, em cada intervalo de tempo de armazenamento monitorado. Avaliação dos parâmetros físicos e físico-químicos foram realizados a cada três dias, por doze dias de armazenamento refrigerado a 5 °C.



### **pH, total titratable acidity (TTA), total soluble solids (TSS), soluble solids/total acidity ratio and reducing sugars content**

The pH of the samples was measured using a potentiometer, using 2 g of the sample diluted in 50 mL of distilled water, according to the ISO 1842 (1991) standard. The total titratable acidity (TTA) was determined by titrimetry with 0.1 mol L<sup>-1</sup> of NaOH, with the equivalence point being determined stoichiometrically (approximate pH 8.1), in an automatic titrator (Metrohm 794 Basic Titrimetro). The results were expressed in grams of citric acid per kg of sample (g kg<sup>-1</sup>), according to ISO 750 (1998). The total soluble solids (TSS) content was determined with a portable digital refractometer (PAL-1, Atago), with the results expressed in degrees Brix (ISO 2173, 1978). The TSS/ATT ratio was obtained by the quotient between the soluble solids content and total titratable acidity (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

The content of reducing sugars was quantified according to MACRAE (1998). Sugars were extracted from the samples with ultrasound treatment by adding acetonitrile. The samples were then filtered and subjected to chromatographic analysis (HPLC-IR, Waters® Alliance 2690/5 high performance liquid chromatograph together with Waters® model 2410 refractive index detector). Compounds were identified by comparison of retention time with standards. To prepare the standard solution, 0.125 g of each analytical standard was weighed. The method is based on column chromatographic separation of amino acid (30 cm x 4.6 mm) at a temperature of 30 °C in isocratic elution mode with acetonitrile: water (75:25), under a flow rate of 1.4 mL min<sup>-1</sup>, with an injection volume of 20 µL and 20 min run time. The results were expressed in g per kg of sample (g kg<sup>-1</sup>). All analyses were performed in triplicate.

### **Total anthocyanin content**

The anthocyanin content was determined by spectrophotometry, after extracting the pigment with an EtOH-HCl solution at a concentration of 90:10 v v<sup>-1</sup> (ethanol 95% acidified with 1.5 N hydrochloric acid and pH 1.0 of the extracting solution). The reading was performed with a Specord 205 UV-Visible spectrophotometer at a wavelength of 520 nm (SPAYD; MORRIS, 1981; SISTRUNK; MORRIS, 1978). The results were expressed in g of pelargonidin-3-glucoside per kg of sample (g kg<sup>-1</sup>). The absorbance measurements in each extract were performed in triplicate.

### **pH, acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis totais (SST), sólidos solúveis/acidez total (Ratio) e açúcares redutores**

O pH das amostras foi medido por potenciômetro, utilizando-se 2 g de amostra diluída em 50 mL de água destilada de acordo com a norma ISO 1842 (1991). A acidez total titulável (ATT) foi determinada por titulometria com NaOH a 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sendo o ponto de equivalência determinado estequiometricamente (aproximadamente: pH 8,1), em titulador automático (Metrohm 794 Basic Titrimetro). Os resultados foram expressos em g de ácido cítrico por kg da amostra (g kg<sup>-1</sup>) ISO 750 (1998). O teor de Sólidos solúveis totais (SST) foi determinado em refratômetro digital portátil (Pal-1, Atago), sendo os resultados expressos em graus Brix (ISO 2173, 1978). A relação SST/ATT foi obtida pela razão entre o teor de sólidos solúveis e de acidez total titulável (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A quantificação de açúcares redutores foi determinada de acordo com Macrae (1998). Os açúcares foram extraídos das amostras em ultrassom, adicionados de acetonitrila. As amostras foram então filtradas e submetidas à análise cromatográfica (HPLC- IR, Waters® Alliance 2690/5 High Performance Liquid Chromatograph, Waters® modelo 2410 detector de índice de refração). Os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção dos padrões. Para preparar a solução padrão, foram pesados 0,125 g de cada padrão analítico. O método é baseado na separação cromatográfica de amino coluna (Amino 30 cm x 4,6 mm, Carbohidrato de Alto Desempenho) a uma temperatura de 30 °C em modo de eluição isocrática com acetonitrila: água (75:25), sob um fluxo de 1,4 mL min<sup>-1</sup>, com volume de injeção de 20 µL e tempo de execução de 20 min. Os resultados foram expressos em g por kg da amostra (g kg<sup>-1</sup>). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **Teor de antocianinas totais**

O conteúdo de antocianinas foi determinado por espectrofotometria, após a extração do pigmento com uma solução de EtOH-HCl a uma concentração de 90:10 v v<sup>-1</sup> (etanol 95 % acidificado com ácido clorídrico 1,5 N e pH da solução extratora de 1,0). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Specord 205 UV-Visible a um comprimento de onda de 520 nm (SPAYD; MORRIS, 1981; SISTRUNK; MORRIS, 1978). Os resultados foram expressos em g de pelargonidina-3-glucósido por kg da amostra (g kg<sup>-1</sup>). As medidas de absorbância em cada extrato foram feitas em triplicata.

### Contents of ascorbic acid and total phenolic compounds

The ascorbic acid (vitamin C) content was determined by HPLC-UV (HPLC-IR, Waters® Alliance 2690/5 high performance liquid chromatograph together with Waters® model 2410 refractive index detector), using the method described by Rosa *et al.* (2007), with ultrasound extraction and 0.05 M sulfuric acid. The results were expressed as g kg<sup>-1</sup> of ascorbic acid per fresh fruit weight.

Total phenolic compounds (TFC) were determined according to the Folin-Ciocalteu, colorimetric method with modifications (SINGLETON; RGALLIC, 1965; GEORGÉ *et al.*, 2005). In summary, fruit samples were submitted to extraction in 70% acetone for 20 min in ultrasonic bath, and then centrifuged at 10,000 × g for 20 min (5 °C).

Subsequently, 0.0005 L of the filtered extract was added to 0.0025 L of a 10% Folin-Ciocalteu solution, and after 2 min, 0.002 L of a sodium carbonate solution was added at 7.5%. After vortexing, the sample was placed in a water bath at 50 °C for 18 min and 5 °C for 30 s. Absorbance was determined with a spectrophotometer at 760 nm wavelength. In parallel, a standard curve of gallic acid equivalent (GAE) was plotted with the following concentrations: 0.02; 0.04; 0.06; 0.08 and 0.1 g L<sup>-1</sup>. The results were expressed in g kg<sup>-1</sup> of GAE per fresh weight of fruit. The measurements of absorbance in each extract were carried out in triplicate.

### Enzymatic activity

The enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was determined according Rodrigues *et al.* (2006). The fruit extract (1.0 g) was homogenized with 0.006 L of an extraction buffer solution (composed of a mixture of 22.2 g of Tris, 0.37 g of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 85.5 g of sucrose and 10 g of polyvinylpyrrolidone (PVP), completed to 1 L with distilled water), followed by centrifugation at 5,000 × g for 10 min at 4 °C. A 200 µL aliquot of the supernatant was then diluted in 0.005 L of extraction buffer.

### Teor de ácido ascórbico e compostos fenólicos totais

O ácido ascórbico (Vitamina C) foi determinado por HPLC-UV ((HPLC-IR, Waters® Alliance 2690/5 High Performance Liquid Chromatograph, Waters® modelo 2410), utilizando o método descrito por Rosa *et al.* (2007), com extração em ultrassom e ácido sulfúrico 0,05 M. Os resultados foram expressos em g kg<sup>-1</sup> de ácido ascórbico por peso fresco de fruta.

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram determinados segundo o método colorimétrico Folin-Ciocalteu, com modificações (SINGLETON; RGALLIC, 1965; GEORGÉ *et al.*, 2005). Em resumo, os extratos da fruta foram extraídos em acetona 70% por 20 min em banho de ultrassom, em seguida centrifugados a 10.000 × g durante 20 min (5 °C).

Posteriormente, 0,0005 L do extrato filtrado foi adicionado a 0,0025 L de uma solução de Folin-Ciocalteu a 10%, e após 2 min, foi adicionado 0,002 L de uma solução de carbonato de sódio a 7,5%. Após agitação em vórtice, a amostra foi colocada num banho de água a 50 °C durante 18 min e a 5 °C durante 30 s. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 760 nm de comprimento de onda. Em paralelo, foi traçada uma curva padrão de equivalente ácido gálico (GAE) com as seguintes concentrações: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,1 g L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em g kg<sup>-1</sup> de equivalente de ácido gálico (GAE) por peso fresco de fruta. As medições de absorbância em cada extrato foram realizadas em triplicata.

### Atividade enzimática

A atividade enzimática da Fenilalanina Amonia-Liase (PAL) foi determinada segundo Rodrigues *et al.* (2006). O extrato da fruta (1,0 g) foi homogeneizado com 0,006 L de uma solução tampão de extração (composto por uma mistura de 22,2 g de Tris, 0,37 g de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 85,5 g de sacarose e 10 g de polivinilpirrolidona (PVP), avolumada para 1 L com água destilada), seguido de centrifugação a 5.000 × g durante 10 min a 4 °C. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi diluída em 0,005 L do tampão de extração.



PAL activity was evaluated based on the absorption difference resulting from the conversion of phenylalanine into trans-cinnamic acid, as described by Hyodo et al. (1978). For this, 0.0015 L of the extracted enzyme, 0.001 L of extraction buffer and 0.0005 L of phenylalanine ( $49.6 \text{ g L}^{-1}$ ) were pipetted into a test tube. The mixture was incubated at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  for 60 minutes and the reaction was stopped by placing the tubes in an ice water bath ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), followed by readings with a spectrophotometer (Specord 205 Uv-visible) at a wavelength of 290 nm.

The peroxidase activity (POD) was determined according to Campos and Silveira (2003). The extraction was performed using 4.0 g of strawberry homogenized with phosphate buffer (0.05M, pH 7.0) for 3 min, after which the material was filtered and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min at  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . To measure POD activity, 0.0015 L of enzyme extract, 0.0025 L of citrate-phosphate buffer (0.1M, pH 5.0), 0.00025 L of 0.5% guaiacol and 0.00025 L of 3% hydrogen sodium peroxide were mixed in a test tube. The tube was placed in a water bath at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  for 15 min and the reaction was stopped in an ice water bath ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). After that, 0.00025 L of 2% sodium metabisulphite was added. Readings were performed with a spectrophotometer (Specord 205 Uv-visible) at a wavelength of 470 nm.

Polyphenol oxidase (PPO) activity was determined according to Campos and Silveira (2003). The extraction was performed from 6.0 g of strawberry homogenized with phosphate buffer (0.05 M; pH 7.0). The material was filtered and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min at  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . The reaction was carried out in 0.001 L of enzyme extract, 0.0036 L of phosphate buffer (0.1M; pH 7.0), and 0.001 L of catechol (0.1 M) in each test tube. After shaking, the tubes were left in a water bath at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  for 30 minutes, and the reaction was stopped by placing them in an ice water bath at  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Then 0.0008 L of perchloric acid (2 N) was added. Readings were performed in a spectrophotometer (Specord 205 UV-visible) at a wavelength of 395 nm. All enzyme activity results are expressed as units  $\text{g}^{-1}$  of fresh fruit weight.

A atividade PAL foi avaliada com base na diferença de absorção resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico Hyodo et al. (1978) consisting of numerous small brown spots on the midrib of head lettuce (*Lactuca sativa*). Para isto, 0,0015 L do extrato enzimático, 0,001 L do tampão de extração e 0,0005 L de fenilalanina ( $49,6 \text{ g L}^{-1}$ ) foram pipetados em um tubo de ensaio. A mistura foi incubada a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 60 minutos e a reação foi interrompida colocando os tubos em banho de água gelada ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), seguido por leituras em espectrofotômetro (Specord 205 UV-Visible) a um comprimento de onda de 290 nm.

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com Campos e Silveira (2003). A extração foi realizada a partir de 4,0 g de morango homogeneizado com tampão fosfato (0,05M, pH 7,0) por 3 min, o material foi filtrado e centrifugado a  $10.000 \times g$  por 10 min a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para medir a atividade da POD, 0,0015 L de extrato enzimático, 0,0025 L de tampão fosfato citrato (0,1M, pH 5,0), 0,00025 L de 0,5% guaiacol e 0,00025 L de 3% de peróxido de hidrogênio foram misturados em tubo de ensaio. O tubo foi deixado em banho de água a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 min e a reação foi interrompida por banho de água gelada ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Depois disso, 0,00025 L de metabissulfito de sódio a 2% foi adicionado. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Specord 205 UV-Visible) a um comprimento de onda de 470 nm.

A atividade de polifenol oxidase (PPO) foi determinada de acordo com Campos e Silveira (2003). A extração foi realizada a partir de 6,0 g de morango homogeneizado com tampão fosfato (0,05 M; pH 7,0). O material foi filtrado e centrifugado a  $10.000 \times g$  por 10 min a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . A reação foi realizada em 0,001 L de extrato enzimático, 0,0036 L de tampão fosfato (0,1M; pH 7,0), e 0,001 L de catecol (0,1 M) em cada tubo de ensaio. Após a agitação, os tubos foram deixados em banho-maria a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, e a reação foi interrompida colocando-os em um banho de água a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, foi adicionado 0,0008 L de ácido perclórico (2 N). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Specord 205 UV-Visible) a um comprimento de onda de 395 nm. Todos os resultados da atividade enzimática foram dados como Units  $\text{g}^{-1}$  de peso fresco da fruta.

## Incidence of rot

During storage, the fruits were visually evaluated every two days regarding the number affected by postharvest rot. Strawberries with visible mold growth were considered rotten and the percentage of rotten fruit was used to express the decay rate of each treatment. Four replicates per treatment and eight fruits per repetition were used in this analysis, totaling 32 fruits per treatment. The analysis was completed on the 10th day, when the incidence of phytopathogens reached 100%, that is, all fruits showed signs characteristic of postharvest diseases.

In the evaluation of pathogen incidence (%), four replications per treatment and eight fruits per replication were used, making a total of 32 fruits per treatment. The visual evaluation was carried out every two days, for 10 days of storage, regarding the number of fruits with postharvest rot. Strawberries with visible fungal growth were quantified to express the decay rate of each treatment during storage.

## Statistical Analysis

The experiment to evaluate the physical, physicochemical and microbiological parameters of strawberries was carried out in a completely randomized design, in a factorial scheme. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) to compare treatments on each day of storage and the effect of storage time within each treatment, followed by the Tukey test to detect differences of the means ( $p \leq 0.05$ ). To evaluate the effect of storage time on the treatments, linear and quadratic regression analysis was performed. Analyses were performed using the statistical program R version 4.1.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Mass

Mass loss above 6% is a limiting factor for the postharvest life of strawberries, making their marketing and consumption inappropriate (MORAES *et al.*, 2008). Table 1 shows the effect of treatments applied to minimally processed strawberries in terms of mass loss. There was no interaction between treatments and storage time.

## Incidência de podridões

Durante o armazenamento, os frutos foram avaliados visualmente, a cada dois dias, quanto ao número de podridões pós-colheita. Morangos com crescimento visível de fungos foram considerados podres e a porcentagem de fruta apodrecida foi usada para expressar a taxa de apodrecimento de cada tratamento. Quatro repetições por tratamento e oito frutas por repetição foram utilizadas nesta análise, totalizando 32 frutos por tratamento. A análise foi concluída no 10º dia, quando a incidência de fitopatógenos atingiu 100%, ou seja, todas as frutas apresentaram sinais de fermentos característicos de doenças pós-colheita.

Na avaliação de incidências de patógenos (%), foram empregadas quatro repetições por tratamento e oito frutos por repetição, perfazendo um total de 32 frutos por tratamento. A avaliação visual foi realizada a cada dois dias, por 10 dias de armazenamento, quanto ao número de podridões pós-colheita. Morangos com crescimento visível de fungos foram quantificados para expressar a taxa de apodrecimento de cada tratamento ao longo do armazenamento.

## Análise Estatística

O experimento para avaliação dos parâmetros físicos, físico-químicos e microbiológicos do morango foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via para comparar os tratamentos a cada dia de armazenamento e o efeito do tempo de armazenamento dentro de cada tratamento, seguido pelo teste de Tukey, com o qual foram detectadas diferenças ( $p \leq 0,05$ ). Para avaliar o efeito do tempo de armazenamento nos tratamentos, foi realizada análise de regressão linear e quadrática. As análises foram executadas pelo programa estatístico R versão 4.1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Perda de massa

A perda de massa acima de 6% é um fator limitante para a vida pós-colheita de morangos, tornando seu consumo e comercialização impróprios (MORAES *et al.*, 2008). A Tabela 1 mostra o efeito dos tratamentos aplicado aos morangos minimamente processados em relação à perda de massa. Não houve interação entre os fatores tratamentos e tempo de armazenamento.

**Table 1** - Mass loss (%) during postharvest treatment of minimally processed strawberries, sanitized and stored at 5 °C for 12 days**Tabela 1** - Perda de massa (%) durante a pós-colheita de morangos minimamente processados, higienizados e armazenados a 5 °C durante 12 dias

Treatments	Storage Time (days)*				
	0	3	6	9	12
Oz <sub>0,2</sub>	0±0 <sup>aC</sup>	0.78±0.04 <sup>aBC</sup>	0.78±0.04 <sup>aBC</sup>	4.15±2.28 <sup>aaB</sup>	5.99±1.82 <sup>aA</sup>
Oz <sub>0,5</sub>	0±0 <sup>aB</sup>	0.75±0.07 <sup>aB</sup>	2.19±1.10 <sup>aB</sup>	5.21±1.35 <sup>aA</sup>	7.45±1.36 <sup>aA</sup>
Oz <sub>1,0</sub>	0±0 <sup>aC</sup>	2.88±1.98 <sup>aBC</sup>	3.34±2.31 <sup>aABC</sup>	5.17±1.09 <sup>aaB</sup>	7.03±1.14 <sup>aA</sup>
Chlorine	0±0 <sup>aD</sup>	0.79±0.10 <sup>aCD</sup>	1.84±0.52 <sup>aC</sup>	3.41±0.65 <sup>aB</sup>	5.50±0.69 <sup>aA</sup>
Control	0±0 <sup>aB</sup>	0.84±0.04 <sup>aB</sup>	2.24±0.95 <sup>aB</sup>	5.90±1.41 <sup>aA</sup>	8.43±1.41 <sup>aA</sup>
<b>General Mean</b>	<b>0±0</b>	<b>1.21±0.93</b>	<b>2.08±0.92</b>	<b>4.77±0.98</b>	<b>6.88±1.17</b>

\* Values represent the mean (±SD) of three replicates (n). Means followed by the same lowercase letters in the column and uppercase letters in the row do not differ significantly by the Tukey test ( $p > 0.05$ ).

\* Os valores representam a média (±D.P.) de três repetições (n). As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

Thus, as there was no difference ( $p > 0.05$ ) between treatments within each day of storage. In general, minimally processed strawberries “Camino Real” reached 88±1.17% weight loss on day 12, a value above the limit established by Moraes *et al.* (2008). However, on day 9 the fruits lost an average of 4.77±0.98% of mass, remaining within acceptable marketing and consumption standards.

When analyzing the behavior of the samples during the days of storage, a gradual mass loss was observed for all treatments ( $p \leq 0.05$ ) (Table 1). Mass loss almost exclusively reflects the loss of water, since other fruit aspects that can deteriorate during storage, such as flavor and gaseous products of respiration, are practically undetectable in terms of mass loss (SOUZA *et al.*, 2015).

According to Moraes *et al.* (2008), minimally processed strawberries sanitized by chlorination and stored at 5 °C lost 6.6% of their weight after seven days of storage. Some studies have reported less weight loss in strawberries exposed to O<sub>3</sub> gas. Nadas *et al.* (2003) reported lower fresh weight loss of strawberries sanitized with O<sub>3</sub> gas (1.5 µL L<sup>-1</sup>) and stored at 2 °C for 3 days compared to strawberries without sanitation. The authors attributed this result to the action of O<sub>3</sub> in reducing mass loss by lowering the respiratory rate of the fruit associated with refrigerated storage. However, when stored at room temperature, they did not obtain the same results.

Assim, como não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada dia de armazenamento. Em geral, morangos minimamente processados cv. Camino Real atingiram 88±1,17% de perda de massa no dia 12, valor acima do limite estabelecido por Moraes *et al.* (2008). Contudo, no dia 9 os frutos perderam em média 4,77±0,98 % de massa, mantendo-se dentro dos padrões aceitáveis de consumo e comercialização.

Ao analisar o comportamento das amostras ao longo dos dias de armazenamento, observou-se perda de massa gradual para todos os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1). A perda de massa retrata, quase exclusivamente, a perda de água, uma vez que outros componentes dos frutos que podem ser perdidos ao longo do armazenamento, como: sabores ou produtos gasosos da respiração, que são praticamente indetectáveis em termos de perda de massa (SOUZA *et al.*, 2015).

De acordo com Moraes *et al.* (2008), morangos minimamente processados higienizados por cloração e armazenados a 5 °C perderam 6,6 % do seu peso após 7 dias de armazenamento. Alguns estudos relataram menor perda de peso em morangos expostos a O<sub>3</sub> gasoso. Nadas *et al.* (2003) relataram menor perda de peso fresco de morangos sanitizados com O<sub>3</sub> gasoso (1,5 µL L<sup>-1</sup>) e armazenados a 2 °C durante 3 dias em relação a morangos sem sanitização. Os autores associam esse resultado à atuação do O<sub>3</sub> em reduzir a perda de massa ao baixar a taxa respiratória do fruto associado ao armazenamento refrigerado. Contudo, quando armazenado à temperatura ambiente, não obtiveram os mesmos resultados.

Contigiani *et al.* (2018) evaluated washing with ozonized water of strawberries cv. Albion for different times at a concentration of 3.5 mg L<sup>-1</sup>. Sanitization for 5 minutes reduced mass loss compared to fruits without sanitization (Control) during refrigerated storage (5 °C). Strawberries subjected to the washing process with ozonized water for longer times (10 and 15 min) did not show any reduction in mass loss. The authors reported that such alterations could be correlated with changes in the cell wall and loss of fruit turgor when sanitized for longer periods.

Therefore, although the aqueous ozone treatments did not present different mass loss in relation to the chlorination and control groups, the minimum processing of strawberries associated with ozonation, within the tested application time (5 min) and at the low concentrations studied, can be considered a potential alternative without causing drastic losses in sensory quality.

### Flesh firmness

There was an interaction ( $p \leq 0.05$ ) between sanitization and storage time on strawberry flesh firmness. After unfolding the interaction, differences ( $p \leq 0.05$ ) were detected between the treatments for 6 and 12 days. On day 6, the Oz<sub>0.2</sub> group showed greater firmness in comparison with the Oz<sub>1.0</sub>, Chlorine and Control treatments. However, on day 12 the differences were greater. Fruits treated with ozone did not differ among themselves, but they showed greater firmness on the last day of evaluation in comparison with the Chlorine and Control treatments (Table 2).

Although the values did not present significant differences on the previous evaluation days, the treatments involving ozonation were more significant in preserving firmness over the storage period (Table 2). Thus, the activity of the enzymes pectin methylesterase and polygalacturonase, associated with pectin degradation, may have been delayed by ozonation, minimizing fruit softening, although it is not yet known how O<sub>3</sub> acts on these enzymes.

Contigiani *et al.* (2018) avaliaram a lavagem com água ozonizada em morangos cv. Albion por diferentes tempos e concentração de 3,5 mg L<sup>-1</sup>. A sanitização por 5 minutos reduziu a perda de massa em comparação com os frutos sem sanitização (controle) durante o armazenamento refrigerado (5 °C). Morangos submetidos ao processo de lavagem com água ozonizada por tempos mais longos (10 e 15 min) não mostraram qualquer redução na perda de massa. Os autores relataram que tais alterações poderiam ser correlacionadas com a alteração da parede celular e perda de turgescência do fruto quando higienizado por períodos mais longos.

Portanto, apesar dos tratamentos com ozônio aquoso não apresentarem perda de massa diferentes em relação a Cloração e ao Controle, o processamento mínimo de morangos associado à ozonização, dentro do tempo de aplicação submetido (5 min) e das baixas concentrações estudadas, pode ser considerado uma alternativa potencial, sem causar perdas drásticas na qualidade sensorial.

### Firmeza da polpa

Houve interação ( $p \leq 0,05$ ) entre sanitização e tempo de armazenamento na firmeza da polpa dos morangos. Após o desdobramento da interação, detectou-se diferenças ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos para os dias 6 e 12. No dia 6, o tratamento Oz<sub>0.2</sub> apresentou maior firmeza quando comparado aos tratamentos Oz<sub>1.0</sub>, Cloro e Controle. Contudo, no dia 12, as diferenças apresentaram-se mais expressivas; frutos tratados com ozônio não diferiram entre si, contudo apresentaram maior firmeza na última de avaliação, quando comparados aos tratamentos Cloro e Controle (Tabela 2).

Apesar dos valores não apresentarem diferenças significativas nas datas anteriores de avaliação, os tratamentos envolvendo a ozonização foi mais significativa na preservação da firmeza ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 2). Assim, a atividade das enzimas pectinometilesterase e poligalacturonase, associadas à degradação da pectina pode ter sido retardada pela ozonização, minimizando o amolecimento dos frutos, embora ainda não se saiba como o O<sub>3</sub> atua sobre estas enzimas.

**Table 2** - Firmness (N) during postharvest of minimally processed strawberries, cleaned and stored at 5 °C for 12 days**Tabela 2** - Firmeza (N), durante a pós-colheita, de morangos minimamente processados, higienizados e armazenados a 5 °C durante 12 dias

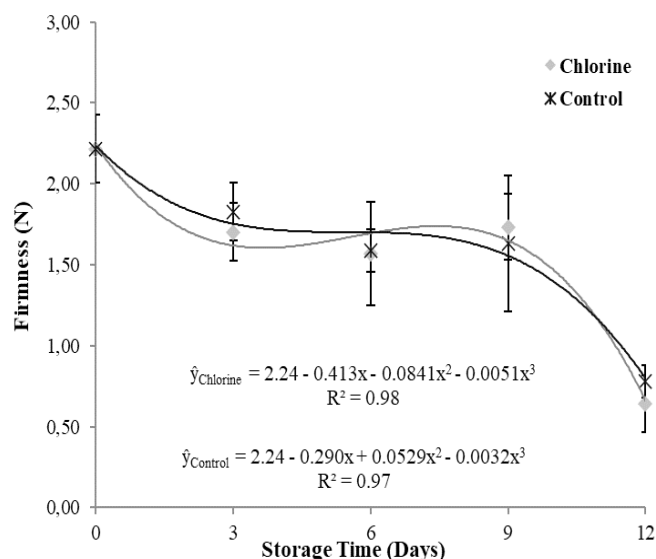
Treatments	Storage Time (days)*				
	0	3	6	9	12
Oz <sub>0.2</sub>	2.22±0.21 <sup>aAB</sup>	1.61±0.12 <sup>aB</sup>	2.41±0.32 <sup>aAB</sup>	1.92±0.06 <sup>aA</sup>	1.61±0.41 <sup>aB</sup>
Oz <sub>0.5</sub>	2.22±0.21 <sup>aA</sup>	2.09±0.19 <sup>aA</sup>	1.81±0.31 <sup>abA</sup>	2.11±0.07 <sup>aA</sup>	1.73±0.83 <sup>aA</sup>
Oz <sub>1.0</sub>	2.22±0.21 <sup>aA</sup>	2.00±0.29 <sup>aA</sup>	1.68±0.15 <sup>bA</sup>	1.90±0.23 <sup>aA</sup>	1.97±0.47 <sup>aA</sup>
Chlorine	2.22±0.21 <sup>aA</sup>	1.70±0.18 <sup>aA</sup>	1.57±0.32 <sup>bA</sup>	1.73±0.20 <sup>aA</sup>	0.64±0.18 <sup>bB</sup>
Control	2.22±0.21 <sup>aA</sup>	1.83±0.18 <sup>aA</sup>	1.59±0.13 <sup>bA</sup>	1.63±0.42 <sup>aA</sup>	0.78±0.10 <sup>bB</sup>
<b>General Mean</b>	<b>2.22±0.18</b>	<b>1.85±0.25</b>	<b>1.81±0.39</b>	<b>1.86±0.26</b>	<b>1.35±0.68</b>

\* Values represent the mean ( $\pm$ SD) of three replicates (n). Means followed by the same lowercase letters in the column and uppercase letters in the row do not differ significantly by the Tukey test ( $p > 0.05$ ).

\* Os valores representam a média ( $\pm$ D.P.) de três repetições (n). As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

Fruit firmness remained stable throughout storage time for treatments Oz<sub>0.5</sub> and Oz<sub>1.0</sub> ( $p > 0.05$ ), while it differed ( $p \leq 0.05$ ) for the Oz<sub>0.2</sub>, Chlorine and Control treatments (Table 2, Figure 2). However, the Oz<sub>0.2</sub> could not be modeled. The behavior of the Chlorine and Control treatments as a function of time was adjusted to the cubic model (Figure 2). For these treatments, the firmness value remained stable until day 9, followed by a significant reduction on day 12.

A firmeza dos frutos manteve-se estável ao longo do tempo de armazenamento para os tratamentos Oz<sub>0.5</sub> e Oz<sub>1.0</sub> ( $p > 0,05$ ). Foi observado diferença ( $p \leq 0,05$ ) para os tratamentos Oz<sub>0.2</sub>, Cloro e Controle (Tabela 2, Figura 2). Contudo, o tratamento Oz<sub>0.2</sub> não foi possível ser modelado. O comportamento dos tratamentos Cloro e Controle em função do tempo foi ajustado ao modelo cúbico (Figura 2). Para esses tratamentos, o valor de firmeza manteve-se estável até o dia 9 com redução significativa no dia 12.



**Figure 2** - Firmness of minimally processed strawberries sanitized and stored at 5 °C for 12 days. Overall averages for each day of storage are plotted at each point, and the bars show the standard deviation.

**Figura 2** - Firmeza de morangos minimamente processados higienizados e armazenados a 5 °C durante 12 dias. As médias gerais em cada dia de armazenamento são representadas em cada ponto, e as barras mostram o desvio padrão.



Alexandre *et al.* (2012) reported behavior similar to that of the present study, investigating strawberries washed in ozonated water ( $0.003 \text{ g L}^{-1}$ ) for 2 min, in which the fruits showed a reduction in firmness during storage at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 13 days compared to strawberries sanitized in distilled water. Aday and Caner (2014) observed a positive effect of aqueous ozonation on the firmness of strawberries, one of the main factors that limit postharvest life.

## Color

Color is an indicator of ripeness and is an essential parameter of strawberry quality, since it directly influences consumer preference and acceptance (ZANG, 2020). The effect of treatments on the color of minimally processed strawberries are shown in Table 3. There was no interaction between the studied factors ( $p > 0.05$ ) for the studied color variables,  $L^*$ ,  $a^*$  and  $\text{Hue}^{\circ}$ .

Alexandre *et al.* (2012) relataram comportamento semelhante ao do presente estudo investigando morangos higienizados em água ozonizada ( $0,003 \text{ g L}^{-1}$ ) durante 2 min, no qual os frutos apresentaram redução da firmeza durante o armazenamento a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 13 dias em relação aos morangos higienizados em água destilada. Aday e Caner (2014), também, observaram efeito positivo da ozonização aquosa sobre a firmeza dos morangos, um dos principais fatores que limitam a vida pós-colheita.

## Cor

A cor é um indicador de maturação, sendo um parâmetro essencial de qualidade de morangos, pois influencia diretamente na preferência e aceitação dos consumidores (ZANG, 2020). O efeito dos tratamentos na cor dos morangos minimamente processados encontra-se na Tabela 3. Não houve interação entre os fatores estudados ( $p > 0,05$ ) para as variáveis de cor estudadas,  $L^*$ ,  $a^*$  e  $\text{Hue}^{\circ}$ .

Table 3 - Color of freshly processed strawberries, cleaned and stored at  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for 12 days

Tabela 3 - Cor de morangos minimamente processados, higienizados e armazenados a  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 dias

Parameter	Treatments	Storage Time (days)"				
		0	3	6	9	12
$L^*$	Oz <sub>0,2</sub>	31.59±0.20 <sup>aAB</sup>	30.22±0.17 <sup>aAB</sup>	32.50±0.84 <sup>aA</sup>	31.89±0.93 <sup>aAB</sup>	29.33±1.98 <sup>aB</sup>
	Oz <sub>0,5</sub>	31.59±0.20 <sup>aA</sup>	30.30±0.56 <sup>aA</sup>	32.97±1.37 <sup>aA</sup>	31.79±1.87 <sup>aA</sup>	30.79±1.53 <sup>aA</sup>
	Oz <sub>1,0</sub>	31.59±0.20 <sup>aB</sup>	29.25±0.88 <sup>aC</sup>	34.03±0.72 <sup>aA</sup>	32.25±0.88 <sup>aB</sup>	31.07±0.17 <sup>aB</sup>
	Chlorine	31.59±0.20 <sup>aAB</sup>	30.79±0.98 <sup>aBC</sup>	33.66±1.47 <sup>aA</sup>	32.50±1.04 <sup>aAB</sup>	29.02±0.45 <sup>aC</sup>
	Control	31.59±0.20 <sup>aA</sup>	29.29±0.89 <sup>aB</sup>	33.28±0.53 <sup>aA</sup>	32.74±0.39 <sup>aA</sup>	31.63±1.09 <sup>aA</sup>
$a^*$	Oz <sub>0,2</sub>	28.10±2.38 <sup>aA</sup>	28.42±1.53 <sup>aA</sup>	23.93±1.26 <sup>aB</sup>	23.94±0.85 <sup>aB</sup>	25.30±0.39 <sup>abAB</sup>
	Oz <sub>0,5</sub>	28.10±2.38 <sup>aA</sup>	26.46±0.82 <sup>abcA</sup>	25.02±1.78 <sup>aA</sup>	24.88±1.63 <sup>aA</sup>	27.53±1.55 <sup>aA</sup>
	Oz <sub>1,0</sub>	28.10±2.38 <sup>aA</sup>	27.42±1.26 <sup>abA</sup>	23.42±3.27 <sup>aA</sup>	25.73±1.05 <sup>aA</sup>	25.05±0.75 <sup>ba</sup>
	Chlorine	28.10±2.38 <sup>aA</sup>	23.72±1.48 <sup>aB</sup>	22.17±0.69 <sup>aB</sup>	23.44±2.33 <sup>aB</sup>	24.11±0.69 <sup>baB</sup>
	Control	28.10±2.38 <sup>aA</sup>	24.16±0.91 <sup>bcBC</sup>	21.07±0.67 <sup>aC</sup>	25.17±1.39 <sup>aAB</sup>	24.67±0.80 <sup>baBC</sup>
$\text{Hue}^{\circ}$	Oz <sub>0,2</sub>	14.96±0.15 <sup>aA</sup>	15.11±1.27 <sup>aA</sup>	11.02±2.63 <sup>aA</sup>	11.25±1.73 <sup>aA</sup>	11.55±1.14 <sup>aA</sup>
	Oz <sub>0,5</sub>	14.96±0.15 <sup>aA</sup>	14.80±0.11 <sup>aA</sup>	13.97±2.29 <sup>aA</sup>	12.00±1.71 <sup>aA</sup>	13.46±1.08 <sup>aA</sup>
	Oz <sub>1,0</sub>	14.96±0.15 <sup>aA</sup>	14.44±2.06 <sup>aAB</sup>	14.42±1.22 <sup>aAB</sup>	12.57±1.21 <sup>aAB</sup>	10.90±1.45 <sup>aB</sup>
	Chlorine	14.96±0.15 <sup>aA</sup>	10.51±4.48 <sup>aA</sup>	10.68±1.75 <sup>aA</sup>	11.30±3.64 <sup>aA</sup>	11.92±2.47 <sup>aA</sup>
	Control	14.96±0.15 <sup>aA</sup>	12.05±3.06 <sup>aA</sup>	11.24±4.66 <sup>aA</sup>	12.78±3.81 <sup>aA</sup>	13.57±3.73 <sup>aA</sup>

\*Values represent the mean ( $\pm$ SD) of three replicates (n). The averages followed by the same lowercase letters in the column and uppercase in the row, for each studied parameter, do not differ significantly by the Tukey test ( $p > 0.05$ ).

\* Os valores representam a média ( $\pm$ D.P.) de três repetições (n). As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada parâmetro estudado, não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

There was no difference ( $p > 0.05$ ) between treatments within each storage day for the  $L^*$  and  $Hue^\circ$  parameters. However, for the parameter  $a^*$ , there was a difference between the treatments from days 3 to 12, when the fruits in the  $Oz_{0.2}$  group showed stronger reddish color in comparison with Chlorine and Control groups.

When analyzing the behavior of the samples over the storage time, we observed a difference in the studied color variables,  $L^*$ ,  $a^*$  and  $Hue^\circ$  ( $p \leq 0.05$ ). However, the small fluctuations in values over time may have been related to the variability of the sample. Despite the initial selection of uniform fruits to compose the experiment, ripening and senescence occurred in different ways, since the initial values (zero) did not differ from day 12 for parameters  $a^*$  and  $L^*$ , with the exception of treatment with chlorination, which showed lower luminosity during storage ( $p \leq 0.05$ ).

Similar results to the present study were found by Reis *et al.* (2008). The authors observed an average  $L^*$  value of 29.71 in strawberries "Oso Grande" treated with different sanitizers and stored at 9 °C and 90% RH for 12 days. Aday and Caner (2014) observed an average  $L^*$  value of 30.14 in strawberries sanitized with aqueous ozone (0.075 mg L<sup>-1</sup>) for 5 min and stored at 4 °C. The same authors observed an average  $a^*$  value of 31.29 and found that these values decreased with storage time, regardless of the treatment. According to the authors, this result could be explained by the browning reactions and reduction in the stability of anthocyanins in the fruit. The reduction of anthocyanin stability, in minimally processed strawberries, as well as was observed in the present work.

The typical color of the strawberry epidermis is red/orange, and in the present study it corresponded to an  $H^\circ$  value of 14.96. Unlike our results, Ávila *et al.* (2012) found significantly lower  $H^\circ$  values in strawberries after 8 days of storage at 1 °C, with values ranging between 37.28 and 31.93.

Assim como não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada dia de armazenamento para os parâmetros  $L^*$  e  $Hue^\circ$ . Contudo, para o parâmetro  $a^*$  houve diferença entre os tratamentos dentro dos dias 3 e 12, quando o tratamento  $Oz_{0.2}$  evidenciou a preservação da coloração avermelhada, por apresentar valores mais elevados, quando comparado ao Cloro e Controle.

Ao analisar o comportamento das amostras ao longo do tempo de armazenamento, observou-se diferença das variáveis de cor estudadas,  $L^*$ ,  $a^*$  e  $Hue^\circ$  ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, as pequenas oscilações dos valores ao longo do tempo podem estar relacionadas a variabilidade da amostra, que por mais que seja criteriosa e uniforme a seleção inicial dos frutos que irão compor o experimento, o amadurecimento e a senescência ocorrem de maneira distinta, visto que os valores do tempo inicial (zero) não diferem do tempo 12 para os parâmetros  $a^*$  e  $L^*$ , com exceção do tratamento com Cloração, o qual apresentou luminosity menor ao longo do armazenamento ( $p \leq 0,05$ ).

Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Reis *et al.* (2008), os autores observaram um valor médio  $L^*$  de 29,71 em morangos cv. Oso Grande tratados com diferentes sanitizantes e armazenados a 9 °C e 90% UR por 12 dias. Aday e Caner (2014) observaram um valor médio  $L^*$  de 30,14 em morangos higienizados com ozono aquoso (0,075 mg L<sup>-1</sup>) durante 5 min e armazenados a 4 °C. Os mesmos autores observaram um valor médio de  $a^*$  31,29 e observaram que estes valores diminuíram com o tempo de armazenamento, independentemente do tratamento. De acordo com os autores, este resultado pode ser explicado pelas reações de escurecimento e redução da estabilidade das antocianinas no fruto. A redução da estabilidade da antocianina, em morangos minimamente processados, também foi observada no presente trabalho.

A cor típica da epiderme do morango é vermelho/laranja e no presente estudo correspondeu a um valor  $H^\circ$  de 14,96. Diferente deste trabalho, Ávila *et al.* (2012) encontrou valores de  $H^\circ$  significativamente mais baixos nos morangos após 8 dias de armazenamento a 1 °C, com valores que variam entre 37,28 e 31,93.

According to Sautter *et al.* (2011), ozonation is associated with darkening of the epidermis. This is likely caused by the death of epidermal cells caused by  $O_3$ , since it is involved in the hypersensitivity (HR) response, which occurs when a cell undergoes biotic or abiotic stress. For example, an attack by pathogens kills infected cells along with adjacent cells (Langebartels *et al.*, 2002). This occurs due to the formation of reactive oxygen species (ROSs), such as  $H_2O_2$  and  $OH\cdot$ . ROSs cause cell death by causing lipid peroxidation, DNA damage and protein oxidation (GILLER; SINGLER, 1995).

Sautter *et al.* (2011) reported the phytotoxic effect of  $O_3$  on peaches, Nadas *et al.* (2003) on strawberries and Forney *et al.* (2007) on carrots. Forney *et al.* (2007) reported that the deleterious effects on carrots were related to the oxidative *stress* caused by this elicitor. In the present study, the low doses of ozone used were probably fundamental for the absence of these damages. In view of the results reported in the literature and found in the present study, it is important to investigate the combination of  $O_3$  dose and sanitization time to achieve optimal treatment efficiency for each produce type.

### **pH, total acidity, total soluble solids content, and ATT/SST ratio**

When investigating the pH values in minimally processed treated strawberries, we observed no interaction between the studied factors ( $p > 0.05$ ). The effect of days of storage on pH was only observed on day 6, when the pH value of fruits treated with the lowest ozone concentrations ( $Oz_{0.2}$  and  $Oz_{0.5}$ ) were lower than the values of the fruits treated with chlorine ( $3.52 \pm 0.03$ ;  $3.53 \pm 0.02$  and  $3.63 \pm 0.03$ , respectively) ( $p \leq 0.05$ ).

When analyzing the treatments applied during storage, differences were observed in the treatments  $Oz_{0.5}$ ,  $Oz_{1.0}$  and Chlorine ( $p \leq 0.05$ ). However, there was no difference in the pH of the samples corresponding to these treatments from day 0 ( $3.57 \pm 0.02$ ;  $3.57 \pm 0.02$  and  $3.57 \pm 0.02$ , respectively) to day 12 ( $3.50 \pm 0.04$ ;  $3.52 \pm 0.01$  and  $3.51 \pm 0.04$ , respectively). In general, there was a tendency for the results to remain constant until day 12 (Figure 3A), with small oscillations between 3.55 and 3.59.

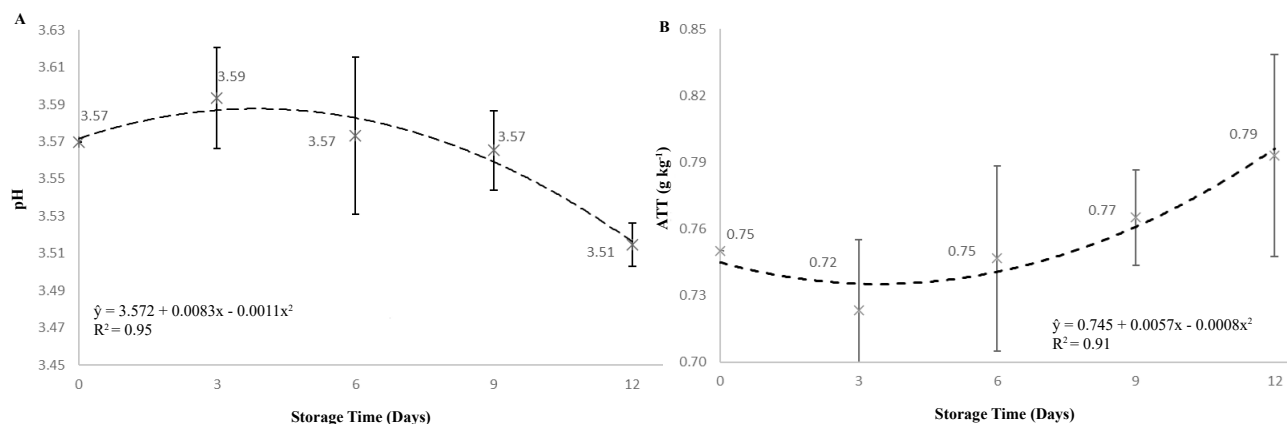
De acordo com Sautter *et al.* (2011), a ozonização está associada ao escurecimento da epiderme. Isto é provavelmente causado pela morte de células epidérmicas provocada pelo  $O_3$ , uma vez que está envolvido na resposta de hipersensibilidade (RH) que ocorre quando uma célula sofre de *stress* biótico ou abiótico. Por exemplo, um ataque por agentes patogênicos mata as células infectadas juntamente com as células adjacentes (Langebartels *et al.*, 2002). Isto ocorre devido à formação de espécies reativas de oxigênio (ROSs), tais como  $H_2O_2$  e  $OH\cdot$ . As ROSs provocam a morte das células, causando a peroxidação dos lípidos, danos no DNA e oxidação das proteínas (GILLER; SINGLER, 1995).

O efeito fitotóxico do  $O_3$  foi relatado por Sautter *et al.* (2011) em pêssegos, Nadas *et al.* (2003) em morangos e Forney *et al.* (2007) em cenouras. Forney *et al.* (2007) relataram que os efeitos deletérios sobre as cenouras estão relacionados ao *stress* oxidativo causado por este elicitor. No presente estudo, as baixas doses de ozônio utilizadas foram, provavelmente, fundamentais para a preservação desses danos. Diante dos resultados reportados na literatura e encontrado no presente trabalho, é importante investigar a combinação de dose de  $O_3$  e tempo de sanitização para se alcançar eficiência do tratamento para cada fruta.

### **pH, acidez total, teor de sólidos solúveis totais, e razão ATT/SST**

Ao investigar os valores de pH em morangos minimamente processados tratados, observou-se que não houve interação entre os fatores estudados ( $p > 0,05$ ). O efeito de dias de armazenamento no pH foi observado, apenas no dia 6, quando o valor de pH dos frutos tratados com as menores concentrações de ozônio ( $Oz_{0.2}$  e  $Oz_{0.5}$ ) foram menores do que frutos tratados com cloro ( $3,52 \pm 0,03$ ;  $3,53 \pm 0,02$  e  $3,63 \pm 0,03$ ; respectivamente) ( $p \leq 0,05$ ).

Ao analisar os tratamentos aplicados ao longo do armazenamento, evidenciou-se diferença nos tratamentos  $Oz_{0.5}$ ,  $Oz_{1.0}$  e Cloro ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, não houve diferença de pH das amostras correspondentes a esses tratamentos do dia 0 ( $3,57 \pm 0,02$ ;  $3,57 \pm 0,02$  e  $3,57 \pm 0,02$ , respectivamente) para o dia 12 ( $3,50 \pm 0,04$ ,  $3,52 \pm 0,01$  e  $3,51 \pm 0,04$ , respectivamente), observando-se tendência para os resultados se manterem constantes até ao 12º dia (Figura 3A), com pequenas oscilações entre 3,55 e 3,59.



**Figure 3** - pH (A) and total titratable acidity (g kg<sup>-1</sup>) (B) of minimally processed strawberries, as a function of storage time in a refrigerated chamber, regardless of treatments\*.

\*Each point on the graph represents the mean of treatments. Error bars of three replicates (n) for each treatment represent the means of standard deviation ( $\pm$ SD).

**Figura 3** - pH (A) e Acidez Total Titulável (g kg<sup>-1</sup>) (B) de morangos minimamente processados, em função do tempo de armazenamento em câmara de refrigeração, independentemente dos tratamentos\*.

\*Cada ponto do gráfico representa a média dos tratamentos. As médias de desvio padrão ( $\pm$ S.D.) são representadas por barras de erro de três réplicas (n) para cada tratamento.

Alexandre *et al.* (2012) and Aday, and Caner (2014) found similar results when investigating ozonized strawberries, obtaining mean pH values of 3.88 and 3.50, respectively. Reis *et al.* (2008) observed unstable pH values of strawberries cv. 'Oso Grande' treated with different sanitizers and stored at 9 °C for 12 days.

In general, after harvesting and during storage, the concentration of organic acids in fruit decreases, since these acids are used as substrates for respiration or are transformed into sugars. However, this behavior may vary in some cases, and the values can increase with maturation, since the transformations vary with the type of tissue, cultivar, degree of maturation and storage conditions, among others (CHITARRA; CHITARRA, 2005). From the point of view of microbiology, the acidity of minimally processed products is beneficial by inhibiting the growth of pathogenic agents that are harmful to human health and degrade sensory quality (MATTIUZ *et al.*, 2004).

When analyzing the behavior of ATT values in minimally processed strawberries after the applied treatments, we observed no interaction between the treatment factors and storage time ( $p > 0.05$ ).

Resultados semelhantes foram encontrados por Alexandre *et al.* (2012) e Aday e Caner (2014) ao investigarem morangos ozonizados, obtendo valores médios de pH de 3,88 e 3,50, respectivamente. Reis *et al.* (2008) observaram valores instáveis de pH de morangos cv. 'Oso Grande' tratados com diferentes sanitizantes e armazenados a 9 °C durante 12 dias.

Em geral, após a colheita e durante o armazenamento, a concentração de ácidos orgânicos na fruta diminui, uma vez que estes ácidos são utilizados como substratos para a respiração ou são transformados em açúcares. No entanto, este comportamento pode variar em alguns casos, e os valores podem aumentar com a maturação, uma vez que as transformações variam com o tipo de tecido, cultivar, grau de maturação, condições de armazenamento, entre outros (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Do ponto de vista da microbiologia, a acidez dos produtos minimamente processados é benéfica ao inibir o crescimento de agentes patogênicos nocivos para a saúde humana e prejudiciais a qualidade sensorial (MATTIUZ *et al.*, 2004).

Ao analisar o comportamento dos valores de ATT em morangos minimamente processados após os tratamentos aplicados, observou-se que não houve interação entre os fatores tratamentos e tempo de armazenamento ( $p > 0,05$ ).

With respect to the behavior of the samples on the days of storage, a difference was observed only on day 6, when the ATT value of fruits treated with chlorine was lower than those treated with ozone (Oz<sub>0,5</sub> and Oz<sub>1,0</sub>) (0.68±0.00; 0.80±0.01 and 0.76±0.05 g citric acid kg<sup>-1</sup>, respectively) ( $p \leq 0.05$ ). However, no applied treatment differed from the Control (0.74±0.03 g citric acid kg<sup>-1</sup>) ( $p > 0.05$ ).

During the storage period, a difference was found only for the Oz<sub>1,0</sub> treatment ( $p \leq 0.05$ ). However, there was no difference in the ATT of the samples corresponding to the treatment from day 0 (0.75±0.03 g citric acid kg<sup>-1</sup>) to day 12 (0.82±0.00 g citric acid kg<sup>-1</sup>), with a tendency for the results to remain stable over time, with small oscillations between 0.72 and 0.79 g kg<sup>-1</sup> of citric acid.

The effects of the treatments of the evaluated samples on the TSS content of the minimally processed strawberries were investigated, and the results are shown in Table 4. On day 3, the Control treatment had a lower TSS content in comparison with the treatments Oz<sub>0,2</sub>, Oz<sub>1,0</sub> and Chlorine. On day 9, the fruits treated with the lowest concentration of aqueous ozone (Oz<sub>0,2</sub>) had the highest TSS content. However, on day 12, no differences ( $p \leq 0.05$ ) were detected between treatments (Table 4). Thus, over time it was possible to observe a reduction in the content of SST.

Ao estudar o comportamento das amostras nos dias de armazenamento, observou-se diferença apenas no dia 6, quando o valor de ATT dos frutos tratados com Cloro foi menor do que frutos tratados com ozônio (Oz<sub>0,5</sub> e Oz<sub>1,0</sub>) (0,68±0,00; 0,80±0,01 e 0,76±0,05 g ácido cítrico kg<sup>-1</sup>, respectivamente) ( $p \leq 0.05$ ). Contudo, nenhum tratamento aplicado diferiu do Controle (0,74±0,03 g ácido cítrico kg<sup>-1</sup>) ( $p > 0.05$ ).

Ao analisar os tratamentos aplicados ao longo do tempo de armazenamento, evidenciou-se diferença apenas para o tratamento Oz<sub>1,0</sub> ( $p \leq 0.05$ ). Contudo, não houve diferença de ATT das amostras que correspondem ao tratamento do dia 0 (0,75±0,03 g ácido cítrico kg<sup>-1</sup>) para o dia 12 (0,82±0,00 g ácido cítrico kg<sup>-1</sup>), observando-se uma tendência para os resultados se manterem estáveis ao longo do tempo, com pequenas oscilações entre 0,72 e 0,79 g de ácido cítrico kg<sup>-1</sup>.

Os efeitos dos tratamentos das amostras avaliadas sobre o teor de SST dos morangos minimamente processados foram investigados, e os resultados encontram-se na Tabela 4. No dia 3, o tratamento Controle apresentou menor conteúdo de SST quando comparado aos tratamentos Oz<sub>0,2</sub>, Oz<sub>1,0</sub> e Cloro. No dia 9, verifica-se que os frutos tratados com a menor concentração de ozônio aquoso (Oz<sub>0,2</sub>) apresentou maior conteúdo de SST. Contudo, no dia 12, não se detectou diferenças ( $p \leq 0.05$ ) entre os tratamentos (Tabela 4). Assim, ao longo do tempo é possível observar redução no conteúdo de SST diminui.

**Table 4** - TSS content and ATT/SST ratio during postharvest of minimally processed strawberries, sanitized and stored at 5 °C for 12 days

**Tabela 4** - Conteúdo de SST e razão ATT/SST durante a pós-colheita, de morangos minimamente processados, higienizados e armazenados a 5 °C durante 12 dias

Parameter	Treatments	Storage Time (days) <sup>a</sup>				
		0	3	6	9	12
SST	Oz <sub>0,2</sub>	8.2±0.1 <sup>Aa</sup>	8.57±0.15 <sup>Aa</sup>	7.97±0.12 <sup>Aab</sup>	8.40±0.10 <sup>Aa</sup>	7.40±0.26 <sup>Ab</sup>
	Oz <sub>0,5</sub>	8.2±0.1 <sup>Aa</sup>	8.07±0.29 <sup>abA</sup>	8.27±0.40 <sup>Aa</sup>	7.77±0.75 <sup>abAB</sup>	7.35±0.05 <sup>Ab</sup>
	Oz <sub>1,0</sub>	8.2±0.1 <sup>Aa</sup>	8.33±0.06 <sup>Aa</sup>	8.23±0.51 <sup>Aa</sup>	7.40±0.10 <sup>Bb</sup>	7.33±0.29 <sup>Ab</sup>
	Chlorine	8.2±0.1 <sup>Aa</sup>	8.33±0.71 <sup>Aa</sup>	7.77±0.21 <sup>Aab</sup>	7.70±0.20 <sup>Bab</sup>	7.50±0.17 <sup>Ab</sup>
	Control	8.2±0.1 <sup>Aa</sup>	7.47±0.06 <sup>Bbc</sup>	7.70±0.30 <sup>Aabc</sup>	7.90±0.10 <sup>abAB</sup>	7.13±0.06 <sup>Ac</sup>
Razão ATT/SST	Oz <sub>0,2</sub>	10.93±0.26 <sup>Aa</sup>	11.45±1.09 <sup>abcA</sup>	10.60±0.56 <sup>Aa</sup>	11.14±0.72 <sup>Aa</sup>	8.84±0.73 <sup>Ab</sup>
	Oz <sub>0,5</sub>	10.93±0.26 <sup>Aa</sup>	10.66±0.59 <sup>bcA</sup>	10.37±0.66 <sup>Aab</sup>	9.97±0.53 <sup>abAB</sup>	9.11±0.94 <sup>abB</sup>
	Oz <sub>1,0</sub>	10.93±0.26 <sup>Aa</sup>	11.80±0.46 <sup>abA</sup>	10.80±0.10 <sup>Aa</sup>	9.38±0.50 <sup>Bb</sup>	8.92±0.52 <sup>Bb</sup>
	Chlorine	10.93±0.26 <sup>Ab</sup>	12.29±1.10 <sup>Aa</sup>	11.38±0.34 <sup>Aab</sup>	10.49±1.21 <sup>abB</sup>	10.40±0.51 <sup>Ab</sup>
	Control	10.93±0.26 <sup>Aa</sup>	10.28±0.29 <sup>Cab</sup>	10.40±0.41 <sup>Aab</sup>	10.28±0.07 <sup>abAB</sup>	9.16±0.37 <sup>abB</sup>

\* Values represent the mean (±SD) of three replicates (n). Means followed by the same lowercase letters in the column and uppercase letters in the row, for each studied parameter, do not differ significantly by the Tukey test ( $p > 0.05$ ).

\* Os valores representam a média (±D.P.) de três repetições (n). As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada parâmetro estudado, não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).



This reduction in TSS can be attributed in part to the mobilization of soluble solids for the respiratory metabolism of the fruit, composed mainly of sugars (glucose, fructose and sucrose), organic acids and soluble pectins (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Similar behavior of strawberries was observed by Aday *et al.* (2013).

The global average TSS of strawberries was around 7.90 °Brix. Nadas *et al.* (2003) reported a similar result (7.3° Brix) for strawberries stored at 2 °C for 3 days in an ozone gas chamber (1.5 µL L<sup>-1</sup>). In turn, Aday and Caner (2014) found lower results for strawberries subjected to aqueous ozonation, obtaining an average TSS value of 5.43 °Brix.

The SST value of a fruit is one of the most important parameters associated with texture and consumer acceptance (ADAY; CANER, 2014). According to Cordenunsi *et al.* (2003), the lower TSS limit for commercial acceptance of fresh strawberries is 7 °Brix. Therefore, regardless of treatment, the minimally processed strawberries remained commercially acceptable up to the 12th day of storage.

The SST/ATT ratio of the treatments varied between 8.92 and 12.29 during storage. The unfolding of the interaction made it possible to observe differences ( $p \leq 0.05$ ) between the treatments for days 3, 9 and 12 (Table 4).

The Oz<sub>1,0</sub> treatment had a lower TSS/ATT ratio on the last day of storage in comparison with Chlorine treatment. Over the storage period, a reduction in the TSS/ATT ratio was observed. Although there were small fluctuations, time 0 showed a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) in relation to time 12 for all treatments studied (Table 4).

According to Chitarra and Chitarra (2005), the TSS/ATT ratio increases with maturation, due to a decrease in acidity. However, in the present study, the ATT remained constant during the storage period, while the TSS level decreased. Therefore, the observed trend in the SST/ATT ratio can be attributed to the decline in SST. This parameter is an important qualitative attribute, since it indicates the inherent flavor of the fruit, which results from the contribution of the components responsible for acidity and sweetness.

Essa redução dos SST pode ser atribuída em parte à mobilização de sólidos solúveis no metabolismo respiratório do fruto, compostos principalmente de açúcares (glucose, frutose e sacarose), ácidos orgânicos e pectinas solúveis (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Comportamento semelhante dos morangos foi observado por Aday *et al.* (2013).

A média global do SST dos morangos foi de cerca de 7,90 °Brix. Resultado semelhante (7,3°Brix) foi relatado por Nadas *et al.* (2003) para morangos armazenados a 2 °C por 3 dias em câmara de ozônio gasoso (1,5 µL L<sup>-1</sup>). Por sua vez, Aday e Caner (2014) encontraram resultados inferiores para morangos submetidos a ozonização aquosa obtendo valor médio de TSS de 5,43 °Brix.

O valor do SST de uma fruta é um dos parâmetros mais importantes associados à textura e aceitação pelo consumidor (ADAY; CANER, 2014). De acordo com Cordenunsi *et al.* (2003), o limite inferior do TSS para aceitação comercial de morangos frescos é de 7 °Brix. Portanto, independente do tratamento, os morangos minimamente processados permaneceram comercialmente aceitáveis até ao 12° dia de armazenamento.

A razão SST/ATT dos tratamentos variou entre 8,92 e 12,29 ao longo do armazenamento. O desdobramento da interação foi possível observar diferenças ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos para os dias 3, 9 e 12 (Tabela 4).

O tratamento Oz<sub>1,0</sub> apresentou razão SST/ATT inferior no último dia de armazenamento, quando comparado ao Cloro. Ao longo do tempo de armazenamento, observou-se redução da razão SST/ATT, embora tenham ocorrido pequenas oscilações, o tempo 0 apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao tempo 12 para todos os tratamentos estudados (Tabela 4).

Segundo Chitarra e Chitarra (2005), a razão SST/ATT aumenta com a maturação, devido à diminuição da acidez. Contudo, no presente estudo, a ATT permaneceu constante durante o período de armazenamento, enquanto o nível de SST diminuiu. Por conseguinte, a tendência observada na razão SST/ATT pode ser atribuída ao declínio dos SST. Esse parâmetro é um importante atributo qualitativo, uma vez que indica o sabor inerente da fruta, que resulta da contribuição dos componentes responsáveis pela acidez e doçura.

## Chemical and biochemical characteristics

There was no interaction between the factors studied ( $p > 0.05$ ) for the characteristics of total sugars (glucose, fructose and sucrose) and total anthocyanins in the strawberries.

Within the storage time factor, the results of the evaluated sugars (fructose, glucose and sucrose) are shown in Figure 4. The fructose content, on day 3, in the samples treated with Oz<sub>0.2</sub> was higher in relation to the Control ( $3.48 \pm 0.02$  and  $2.90 \pm 0.21$ , respectively) ( $p \leq 0.05$ ).

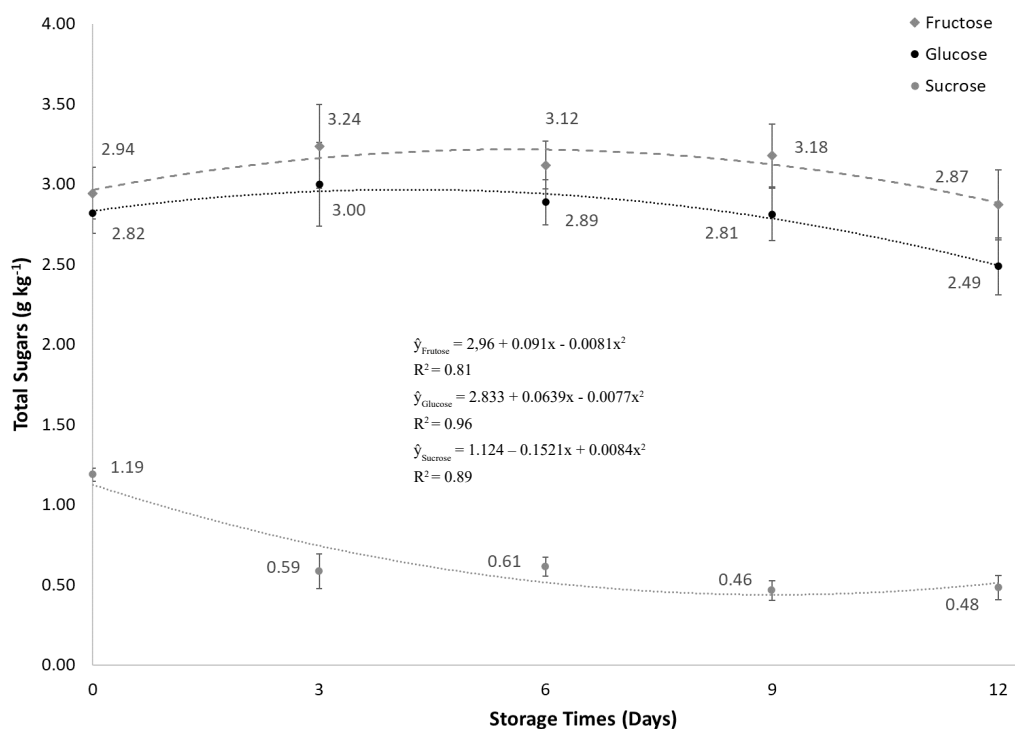
Glucose values showed a difference only on the last day of storage, when the Control treatment had a lower value than samples treated with Oz 1.0 and Chlorine ( $2.25 \pm 0.14$ ;  $2.60 \pm 0.06$  and  $2.63 \pm 0.15$ , respectively) ( $p \leq 0.05$ ). For sucrose, there was no difference between treatments on any of the days analyzed ( $p > 0.05$ ).

## Características químicas e bioquímicas

Não houve interação entre os fatores estudados ( $p > 0,05$ ) para as características açúcares totais (glicose, frutose e sacarose) e antocianinas totais em morangos minimamente processados tratados.

Dentro do fator tempo de armazenamento, os resultados dos açúcares avaliados (Frutose, Glicose e sacarose) encontram-se na Figura 4. O teor de Frutose, no dia 3, nas amostras tratadas com Oz<sub>0.2</sub>, foi maior em relação ao Controle ( $3,48 \pm 0,02$  e  $2,90 \pm 0,21$ , respectivamente) ( $p \leq 0,05$ ).

Os valores de Glicose apresentaram diferença apenas no último dia de armazenamento, quando o tratamento Controle apresentou menor valor do que amostras tratadas com Oz<sub>1.0</sub> e Cloro ( $2,25 \pm 0,14$ ;  $2,60 \pm 0,06$  e  $2,63 \pm 0,15$ , respectivamente) ( $p \leq 0,05$ ). Para sacarose, não houve diferença entre os tratamentos nos dias analisados ( $p > 0,05$ ).



**Figure 4** - Total sugars of minimally processed strawberries as a function of storage time in a refrigerated chamber, regardless of treatments\*.

\*Each point on the graph represents the mean of treatments. Error bars of three replicates (n) for each treatment represent means of standard deviation ( $\pm$ SD).

**Figura 4** - Açúcares totais de morangos minimamente processados, em função do tempo de armazenamento em câmara de refrigeração, independentemente dos tratamentos\*.

\*Cada ponto do gráfico representa a média dos tratamentos. As médias de desvio padrão ( $\pm$ S.D.) são representadas por barras de erro de três réplicas (n) para cada tratamento.

During the storage days, a difference was observed in the treatments Oz<sub>0,2</sub>, Oz<sub>1,0</sub> and Control ( $p \leq 0.05$ ) for fructose content. The glucose content showed difference in treatments Oz<sub>0,2</sub>, Oz<sub>0,5</sub>, Oz<sub>1,0</sub> and Control ( $p \leq 0.05$ ). However, there was no difference in the fructose and glucose content in the samples from day 0 to day 12 (data not shown). Despite small fluctuations over time, these results demonstrate a tendency for these sugars to remain constant throughout storage, with the exception of the Control fruits, where a decrease in glucose content was observed on the last day of storage. In contrast, the sucrose content decreased steadily over time regardless of the treatment applied (Figure 4).

Cordenunsi *et al.* (2003) analyzed physical-chemical changes in strawberries during refrigerated storage (6 °C). According to them, on day 2, the sucrose content disappeared in all cultivars, which was related to the high metabolic activity of the fruits and could be attributed to the consumption of sucrose by the tissue, since the disappearance of sucrose did not result in an increase in levels of glucose and fructose.

In the present study, the reduction in sucrose coincided with an increase in fructose and glucose up to the day 6. Perez *et al.* (1999) observed a decreasing trend in sucrose content along with glucose and fructose levels immediately after treating strawberries with O<sub>3</sub>. The authors suggested that this might have occurred due to the inactivation of other sucrose degradation pathways in response to oxidative stress caused by O<sub>3</sub>. However, this pattern was not observed in the present study, because all treatments showed the same tendency during storage, probably due to the low concentration of O<sub>3</sub> to which the strawberries were submitted.

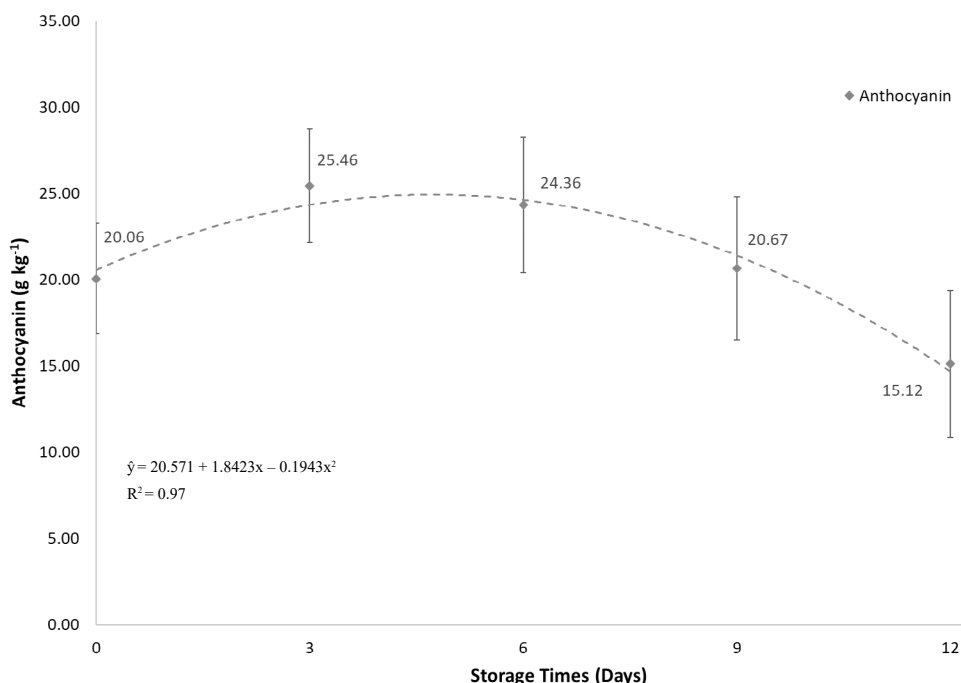
The overall mean concentration of anthocyanins in strawberries was 2.11 g kg<sup>-1</sup> (Figure 5). There was no difference between treatments on the analyzed days ( $p > 0.05$ ). Thus, the effect of ozonation on the oxidation of anthocyanins in this study cannot be affirmed. The behavior of the samples in relation to the concentration of anthocyanins present in the fruits, showed small oscillations over time for the Chlorine and Control treatments ( $p \leq 0.05$ ). However, the anthocyanin values at the initial time (zero) did not differ from the final time (12 days) for the Control fruits. Only fruits from Chlorine treatment showed lower anthocyanin concentrations on the last day of storage in comparison with the initial day ( $p \leq 0.05$ ).

Ao analisar os tratamentos aplicados ao longo do armazenamento, evidenciou-se diferença nos tratamentos Oz<sub>0,2</sub>, Oz<sub>1,0</sub> e Controle ( $p \leq 0,05$ ), para o teor de frutose. O teor de glicose apresentou diferença nos tratamentos Oz<sub>0,2</sub>, Oz<sub>0,5</sub>, Oz<sub>1,0</sub> e Controle ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, não houve diferença no teor de frutose e glicose nas amostras do dia 0 para o dia 12 (dados não apresentados), apesar das pequenas oscilações ao longo do tempo, esses resultados demonstram uma tendência desses açúcares se manterem constantes ao longo do armazenamento, com exceção das frutas Controle, onde observou-se diminuição no teor de glicose no último dia de armazenamento. Em contrapartida, o teor de sacarose diminuiu de forma constante ao longo do tempo independente do tratamento aplicado (Figura 4).

As alterações físico-químicas nos morangos durante o armazenamento refrigerado (6 °C) foram analisadas por Cordenunsi *et al.* (2003). Segundo os autores, no 2º dia o teor de sacarose desapareceu em todas as cultivares, o que foi relacionado a alta atividade metabólica dos frutos podendo contribuir para o consumo de sacarose pelo tecido, já que o desaparecimento da sacarose não resultou em aumento nos teores de glicose e frutose.

No presente estudo, a redução da sacarose coincidiu com aumento da frutose e glicose até ao 6º dia. Pérez *et al.* (1999) observaram tendência decrescente do teor de sacarose juntamente com os níveis de glicose e frutose imediatamente após o tratamento dos morangos com O<sub>3</sub>. Os autores sugeriram que isto pode ter ocorrido devido à inativação de outras vias de degradação da sacarose em resposta ao stress oxidativo causado pelo O<sub>3</sub>. Contudo, este padrão não foi observado no presente estudo, porque todos os tratamentos apresentaram a mesma tendência durante o armazenamento, provavelmente devido à baixa concentração de O<sub>3</sub> a que os morangos foram submetidos.

A concentração média geral de antocianinas nos morangos foi de 2,11 g kg<sup>-1</sup> (Figura 5). Não houve diferença entre os tratamentos nos dias analisados ( $p > 0,05$ ). Dessa forma, não se pode afirmar o efeito da ozonização sob a oxidação das antocianinas nesse estudo. O comportamento das amostras em relação a concentração de antocianinas presentes nos frutos, mostrou pequenas oscilações ao longo do tempo para os tratamentos Cloro e Controle ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, os valores de antocianinas no tempo inicial (zero) não diferem do tempo final (12 dias) para os frutos Controle. Apenas os frutos provenientes do tratamento com Cloro apresentaram concentrações de antocianinas menores no último dia de armazenamento, quando comparado com o dia inicial ( $p \leq 0,05$ ).



**Figure 5** - Total anthocyanins of minimally processed strawberries as a function of storage time in a refrigerated chamber, regardless of the treatments\*.

\*Each point on the graph represents the mean of treatments. Means of standard deviation ( $\pm$ SD) are represented by error bars of three replicates (n) for each treatment.

**Figura 5** - Antocianinas totais de morangos minimamente processados, em função do tempo de armazenamento em câmara de refrigeração, independentemente dos tratamentos\*.

\*Cada ponto do gráfico representa a média dos tratamentos. As médias de desvio padrão ( $\pm$ S.D.) são representadas por barras de erro de três réplicas (n) para cada tratamento.

The content of total anthocyanins in strawberries, in this study, was higher than that reported by Pérez *et al.* (1999). The change in color of strawberries treated with O<sub>3</sub> possibly occurred due to the oxidation of red pigments, such as anthocyanins. The authors observed a reduction in anthocyanin content in fruits kept under ozonation in a controlled atmosphere at 2 °C. Tiwari *et al.* (2009) found significant reductions in anthocyanin content (98.2%) in ozonated strawberry juice. They also observed that the reduction was proportional to the applied concentration and treatment time, that is, the higher the ozone concentration and treatment time, the greater the anthocyanin degradation was.

According to Moraes *et al.* (2008), changes in the pH of the fruits can also influence the metabolism and stability of these pigments, causing loss of color. Despite the degradation of anthocyanins, the decrease in color intensity was small, even at the end of the storage period, since it did not affect the marketability of the fruit from a visual standpoint.

O conteúdo de antocianinas totais nos morangos, neste estudo, foi superior ao relatado por Pérez *et al.* (1999), a alteração da cor dos morangos tratados com O<sub>3</sub> ocorre possivelmente pela oxidação dos pigmentos vermelhos, como é o caso das antocianinas. Os autores observaram uma redução do conteúdo de antocianinas em frutos mantidos sob ozonização numa atmosfera controlada a 2 °C. Tiwari *et al.* (2009) encontraram reduções significativas no teor de antocianinas (98,2%) em suco de morango ozonizado. Observaram também que a redução foi proporcional à concentração aplicada e ao tempo de tratamento, ou seja, quanto maior for a concentração de ozônio e o tempo de tratamento, maior será a degradação das antocianinas.

Segundo Moraes *et al.* (2008), alterações no pH dos frutos também podem influenciar o metabolismo e a estabilidade desses pigmentos, causando perda de cor. Apesar da degradação das antocianinas, a diminuição da intensidade de cor foi pequena, mesmo no final do período de armazenamento, uma vez que não prejudicou a comercialidade da fruta do ponto de vista visual.

These results can be explained by the fact that changes in the  $a^*$  parameter of the color values of treated and untreated strawberries did not differ significantly over the storage period, as previously reported. The effects of treatments on the concentration of ascorbic acid (vitamin C) in minimally processed strawberries are shown in Table 5. The average content of vitamin C in strawberries was  $3.14 \text{ g kg}^{-1}$  during storage. On day 9, the treatments with ozone,  $Oz_{0.2}$  and  $Oz_{1.0}$  showed a higher content of ascorbic acid in comparison with the Chlorine and Control treatments, while the treatment with  $Oz_{0.5}$  showed a difference only from the Control treatment. However, on day 12, the differences were even greater, when the fruits treated with  $Oz_{0.5}$  had a higher content of ascorbic acid. It is noteworthy that on day 9, the average values of vitamin C in the Chlorine and Control treatments showed a sharp decline until the end of storage, while the other ozonated samples showed little variation until day 12 (Table 5). This may be related to the degradation of organic acids, including ascorbic acid, during the natural process of ripening and senescence.

Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que as alterações no parâmetro  $a^*$  dos valores de cor dos morangos tratados e não tratados não diferiram significativamente ao longo do período de armazenamento, como relatado anteriormente. Os efeitos dos tratamentos sobre a concentração de ácido ascórbico (vitamina C) dos morangos, minimamente processados, encontram-se na Tabela 5. O teor médio de vitamina C nos morangos foi de  $3,14 \text{ g kg}^{-1}$  ao longo do armazenamento. No dia 9, os tratamentos com ozônio,  $Oz_{0.2}$  e  $Oz_{1.0}$  apresentaram maior teor de ácido ascórbico quando comparado aos tratamentos Cloro e Controle, enquanto o tratamento com ozônio  $Oz_{0.5}$  apresentou diferença apenas do tratamento Controle. Contudo, no dia 12, as diferenças foram ainda mais expressivas, em que os frutos tratados com ozônio  $Oz_{0.5}$  apresentou maior teor de ácido ascórbico. Ressalta-se que, no dia 9, os valores médios de vitamina C nos tratamentos com Cloro e Controle apresentaram declínio acentuado até o final do armazenamento, enquanto as demais amostras ozonizadas apresentaram pouca variação até o dia 12 (Tabela 5). O que pode estar relacionado com a degradação dos ácidos orgânicos, entre eles o ácido ascórbico, durante o processo natural de amadurecimento e senescência.

**Table 5** - Content of phenolic compounds and ascorbic acid in minimally processed strawberries, cleaned and stored at  $5^\circ\text{C}$  for 12 days

**Tabela 5** - Conteúdo de Compostos fenólicos e Ácido ascórbico de morangos, minimamente processados, higienizados e armazenados a  $5^\circ\text{C}$  durante 12 dias

Parameter	Treatments	Storage Time (days)*				
		0	3	6	9	12
Phenolic Compounds	$Oz_{0.2}$	107.43±2.66 <sup>aA</sup>	110.57±0.61 <sup>bcA</sup>	113.01±1.25 <sup>aA</sup>	83.29±3.51 <sup>cC</sup>	97.52±3.37 <sup>bB</sup>
	$Oz_{0.5}$	107.43±2.66 <sup>aA</sup>	114.94±0.26 <sup>bA</sup>	97.62±0.12 <sup>bcB</sup>	88.88±9.99 <sup>abcC</sup>	96.21±3.37 <sup>abBC</sup>
	$Oz_{1.0}$	107.43±2.66 <sup>aA</sup>	102.64±2.18 <sup>cA</sup>	105.34±1.56 <sup>abA</sup>	84.86±1.14 <sup>bcB</sup>	88.60±9.19 <sup>bB</sup>
	Chlorine	107.43±2.66 <sup>aA</sup>	111.37±1.04 <sup>bA</sup>	93.63±3.43 <sup>cB</sup>	92.06±3.66 <sup>abB</sup>	64.06±1.31 <sup>cC</sup>
	Control	107.43±2.66 <sup>abB</sup>	134.44±1.54 <sup>aA</sup>	96.30±0.90 <sup>cC</sup>	93.35±1.55 <sup>aC</sup>	78.55±1.34 <sup>dD</sup>
	General Mean	107.43±2.24	114.79±11.04	101.18±7.49	88.49±5.91	84.99±13.50
Ascorbic acid	$Oz_{0.2}$	33.30±4.73 <sup>aA</sup>	34.33±5.37 <sup>aA</sup>	40.85±6.15 <sup>aA</sup>	39.35±6.94 <sup>aA</sup>	20.80±3.59 <sup>bB</sup>
	$Oz_{0.5}$	32.55±3.32 <sup>aAB</sup>	43.99±3.70 <sup>aA</sup>	38.74±5.28 <sup>aAB</sup>	29.03±0.49 <sup>abB</sup>	33.44±3.59 <sup>aAB</sup>
	$Oz_{1.0}$	29.94±6.00 <sup>aAB</sup>	41.20±4.22 <sup>aA</sup>	32.30±11.12 <sup>aA</sup>	33.44±1.53 <sup>aA</sup>	18.86±5.08 <sup>bB</sup>
	Chlorine	31.02±5.30 <sup>aA</sup>	42.00±3.51 <sup>aA</sup>	38.17±9.42 <sup>aA</sup>	18.86±5.08 <sup>bcB</sup>	13.56±1.79 <sup>bB</sup>
	Control	34.15±2.27 <sup>aA</sup>	37.47±2.47 <sup>aA</sup>	33.16±5.95 <sup>aA</sup>	13.56±1.79 <sup>cB</sup>	20.80±3.59 <sup>bB</sup>
	General Mean	32.19±4.14	39.80±4.90	36.64±7.53	26.85±10.33	21.49±7.34

\* Values represent the mean ( $\pm$ SD) of three replicates (n). Means followed by the same lowercase letters in the column and uppercase letters in the row, for each studied parameter, do not differ significantly by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

\* Os valores representam a média ( $\pm$ D.P.) de três repetições (n). As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada parâmetro estudado, não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).



Glowacz *et al.* (2015) found similar results in red peppers stored in a chamber with ozone gas at concentrations of 0.1 and 0.3 mol mol<sup>-1</sup> for 14 days at 14 °C. The authors did not observe a significant difference between the studied treatments, reporting a decline in vitamin C only on the last day of storage.

Vitamin C in strawberries predominates in the form of ascorbic acid, with an average content of 6.0 g kg<sup>-1</sup>. However, this value may be related to the cultivar, maturation state and harvest time (CORDENUNSI *et al.*, 2003). In minimal processing of strawberries, the vitamin C content can be a good quality indicator, since the tissues are exposed in the cutting phase, and vitamin C can be lost because it is labile and susceptible to degradation in the presence of light and oxygen. This explains the lowest values found on the 12th day. Ascorbate oxidation by the ascorbate oxidase enzyme increases under stress conditions, such as exposure to pathogenic agents, high temperatures, metal ions, and/or physical or chemical damage, as well as exposure to products containing halogens in their molecules, such as hypochlorite salts used in sanitization (LEE; KADER, 2000).

According to Monaco *et al.* (2016), the sanitization of mangoes with ozonized water for 10 or 20 min, followed by storage in a cold chamber at 14±2 °C for 7 days, did not change the vitamin C content, regardless of the type of cultivation (organic or conventional). However, Allende *et al.* (2007), when studying sanitization of strawberries with gaseous ozone (5 g L<sup>-1</sup>), observed a reduction in ascorbic acid levels after storage for 12 days.

The results of the previous study suggest the existence of a threshold for the O<sub>3</sub> dose and exposure time, that is, at high concentrations and/or a long exposure times, the nutritional quality of foods can deteriorate. However, we did not observe this, strengthening the assumption that minimal processing of strawberries associated with cleaning by ozonation at adequate concentrations and contact times may be an alternative to minimize the deterioration of strawberry quality.

Resultados semelhantes foram encontrados por Glowacz *et al.* (2015) em pimentos vermelhos armazenados em câmara com gás ozono a concentrações de 0,1 e 0,3 mol mol<sup>-1</sup> durante 14 dias a 14 °C. Os autores não observaram diferença significativa entre os tratamentos estudados, reportando declínio na vitamina C apenas no último dia de armazenamento.

A vitamina C em morangos predomina sob a forma de ácido ascórbico, com teor médio de 6,0 g kg<sup>-1</sup>. Contudo, esse valor pode estar relacionado com a cultivar, estado de maturação e tempo de colheita (CORDENUNSI *et al.*, 2003). No processamento mínimo de morangos, o teor de vitamina C pode ser um bom indicador de qualidade, uma vez que os tecidos são expostos na fase de corte, e a vitamina C pode perder-se por ser lábil e susceptível de degradação na presença de luz e oxigênio. Isso explica os valores mais baixos encontrados no 12º dia. A oxidação do ascorbato pela enzima ascorbato-oxidase aumenta em condições de estresse, tais como exposição a agentes patogênicos, altas temperaturas, íons metálicos, e/ou danos físicos ou químicos, bem como exposição a produtos contendo halogênios nas suas moléculas, tais como os sais de hipoclorito utilizados na sanitização (LEE; KADER, 2000).

Segundo Monaco *et al.* (2016), a sanitização de mangas com água ozonizada durante 10 ou 20 min, posteriormente armazenadas em câmara fria a 14±2 °C durante 7 dias, não alterou o conteúdo de vitamina C, independentemente do tipo de cultivo (orgânico ou convencional). Contudo, Allende *et al.* (2007), ao estudarem sanitização de morangos com ozônio gasoso (5 g L<sup>-1</sup>), observaram redução nos níveis de ácido ascórbico 12 dias após armazenamento.

Os resultados do estudo anterior sugerem a existência de um limiar para a dose de O<sub>3</sub> e tempo de exposição, ou seja, em concentrações elevadas e/ou um longo tempo de exposição, a qualidade nutricional dos alimentos pode se deteriorar. No entanto, não se verificou isso no presente estudo, fortalecendo o pressuposto que o processamento mínimo de morangos associados à higienização por ozonização em concentrações e tempos de contato adequados podem ser a alternativa para minimizar a deterioração da qualidade de morangos.

The phenolic compounds of minimally processed strawberries were investigated. There was interaction ( $p \leq 0.05$ ) between treatments and storage time. After unfolding the interaction, differences ( $p \leq 0.05$ ) were detected between treatments for days 3; 6; 9 and 12 (Table 5), where differences between ozonized treatments and Control can be observed, with the exception on day 9.

On the 3rd day of storage, Control fruits had the highest total phenol content ( $13.77 \text{ g kg}^{-1}$ ). However, during storage, this superiority did not last. This fact can be attributed to the distinct and individual maturation of each fruit. On the 12th day after treatment, fruits submitted to ozone ( $\text{Oz}_{0.2}$ ;  $\text{Oz}_{0.5}$  and  $\text{Oz}_{1.0}$ ) contained significantly more total phenols than fruits sanitized with chlorinated water and Control fruits.

The concentration of total phenolic compounds is correlated with the antioxidant capacity, so that its measurement can be used to monitor postharvest quality loss (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Analysis of each treatment during storage indicated that the total content of phenols was more stable in the ozonized samples, with a significant reduction only from day 9 ( $p \leq 0.05$ ). Fruits from the Chlorine and Control treatments showed a significant reduction of compounds from day 6 ( $p \leq 0.05$ ) (Table 5).

Similar results were reported by Allende *et al.* (2007), who observed a reduction in the concentration of total phenols in strawberries submitted to different postharvest treatments, including gaseous ozonation and UV-C during storage for 12 days at  $2^\circ\text{C}$ . The decrease in total phenols during ripening led to a desirable sensory quality, since it reduced the astringency of the fruit. This fact can be explained by the oxidation of these compounds by the action of the enzyme polyphenol oxidase (SHWARTZ *et al.*, 2009).

Yeoh *et al.* (2014) reported differing results for ozone treatment. According to the authors, after exposure of minimally processed papaya to ozone gas ( $9.2 \pm 0.2 \mu\text{L L}^{-1}$ ) for 10 and 20 minutes, the total phenol content increased significantly by 8.3 and 10.3%, respectively. However, when exposing samples for 30 min, there was a 1.2% reduction in total phenols.

Os compostos fenólicos dos morangos minimamente processados foram investigados. Houve interação ( $p \leq 0,05$ ) entre os fatores tratamentos e tempo de armazenamento. Após o desdobramento da interação detectou-se diferenças ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos para os dias 3; 6; 9 e 12 (Tabela 5), onde pode-se observar diferença entre os tratamentos ozonizados em relação Controle, com exceção do dia 9.

No 3º dia de armazenamento, frutos controle apresentaram o maior teor total de fenóis ( $13,77 \text{ g kg}^{-1}$ ). No entanto, durante o armazenamento, esta superioridade não perdurou. Este fato pode ser atribuído à maturação distinta e individual de cada fruta. No 12º dia após o tratamento, frutos submetidos ao ozônio ( $\text{Oz}_{0.2}$ ;  $\text{Oz}_{0.5}$  e  $\text{Oz}_{1.0}$ ) continham significativamente mais fenóis totais do que frutos sanitizados com água clorada e frutos Controle.

A concentração de compostos fenólicos totais está correlacionada com a capacidade antioxidante, de modo que sua medição pode ser usada para monitorar a perda de qualidade pós-colheita (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Ao analisar cada tratamento ao longo do armazenamento, pode-se observar que o conteúdo total de fenóis mais estável para as amostras ozonizadas, com redução significativa apenas a partir do dia 9 ( $p \leq 0,05$ ). Os frutos provenientes dos tratamentos Cloro e Controle apresentaram redução significativa dos compostos a partir do dia 6 ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 5).

Resultados similares foram relatados por Allende *et al.* (2007), que observaram redução na concentração de fenóis totais de morangos submetidos a diferentes tratamentos pós-colheita, entre eles ozonização gasosa e UV-C durante o armazenamento por 12 dias a  $2^\circ\text{C}$ . A diminuição dos fenóis totais durante a maturação leva a uma qualidade sensorial desejável, uma vez que reduz a adstringência da fruta, este fato pode ser explicado pela oxidação destes compostos pela ação da enzima polifenol oxidase (SHWARTZ *et al.*, 2009).

Resultados divergentes para o tratamento de ozônio foram relatados por Yeoh *et al.* (2014). De acordo com os autores, após exposição de mamão papaia minimamente processado ao gás ozônio ( $9,2 \pm 0,2 \mu\text{L L}^{-1}$ ) por 10 ou 20 minutos, o conteúdo de fenóis totais aumentou significativamente em 8,3 e 10,3%, respectivamente. Entretanto, ao expor amostras durante 30 min, houve redução de 1,2% no total de fenóis.

O<sub>3</sub> hyperreactivity can contribute to the inhibition of several enzymes, such as PPO and POD, since these enzymes often cause oxidation of phenolic compounds in fruits and vegetables when cut (YEOH *et al.*, 2014). Inhibition of PPO and POD activity was verified by Chauhan *et al.* (2011) in minimally processed carrots sanitized with aqueous O<sub>3</sub> and stored in a controlled atmosphere.

The reduction in total phenols with prolonged exposure to O<sub>3</sub> may be due to the self-decomposition of O<sub>3</sub>, leading to the production of free radicals. Therefore, due to the antioxidant capacity of phenolic compounds, they can initiate their protective functions or scavenge free radicals, or react directly with O<sub>3</sub>, thus decreasing the polyphenol content in food samples (ALOTHMAN *et al.*, 2010). However, the results of the present work do not indicate an association between the degradation of phenolic compounds and ozonation, since this tendency occurred in all treatments, albeit less gradually in ozonated fruits. The effects of treatments of the evaluated samples on the enzymatic activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) are shown in Figure 6.

There was interaction ( $p < 0.05$ ) between treatments and storage time only for POD. After the unfolding the interaction, differences ( $p < 0.05$ ) were detected between treatments for days 9 and 12. On the last day of storage, fruits treated with the highest concentration of ozonized water (Oz<sub>1.0</sub>) showed greater activity of the POD enzyme in comparison with treatment with chlorinated water (26.95±0.74 and 22.96±0.30 U g<sup>-1</sup>, respectively).

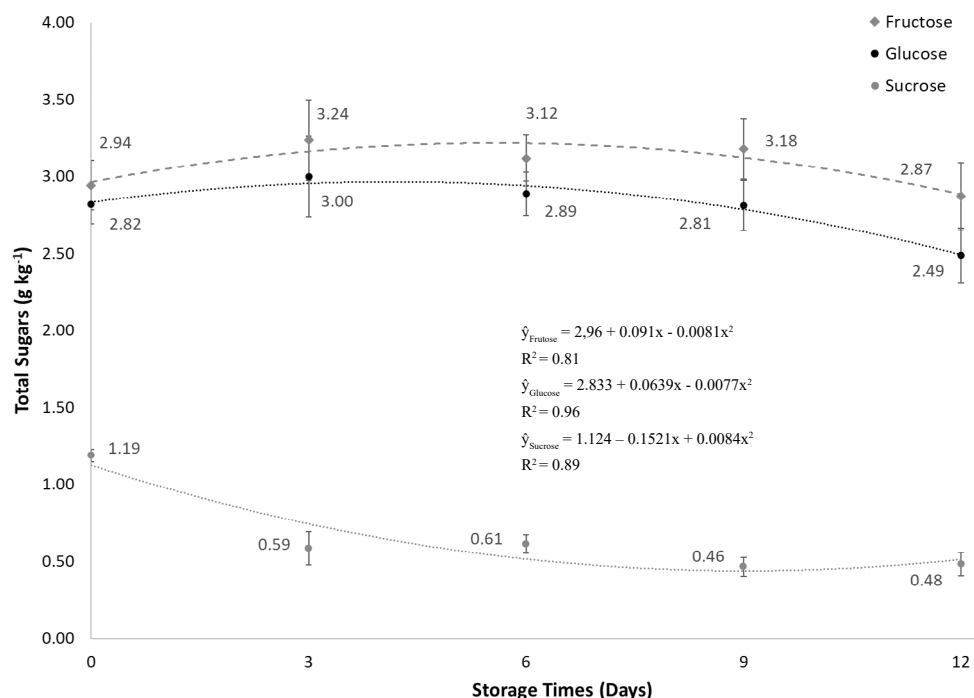
POD activity varied during storage. The greatest increase occurred from the 1st to the 3rd day, from 14.54 to 16.08 U g<sup>-1</sup>, followed by a decrease and then a slight increase to 14.25 U g<sup>-1</sup> at the end of the storage period (Figure 4). The increase in the first three days can probably be explained by the response to cutting the minimally processed strawberries. Tissue death in the cut area elevated the peroxidase activity of nearby cells to repair the injured tissue. The further increase on the 12th day can be attributed to the ripening of each particular fruit.

A hiper-reatividade do O<sub>3</sub> pode contribuir para a inibição de várias enzimas, tais como PPO e POD, uma vez que essas enzimas frequentemente causam a oxidação de compostos fenólicos em frutas e vegetais quando cortadas (YEOH *et al.*, 2014). A inibição da atividade de PPO e POD foi verificada por Chauhan *et al.* (2011) em cenouras minimamente processadas, quando higienizadas com O<sub>3</sub> aquoso e armazenadas em uma atmosfera controlada.

A redução dos fenóis totais com exposição prolongada ao O<sub>3</sub> pode ser devida à auto decomposição do O<sub>3</sub>, levando à produção de radicais livres. Portanto, devido à capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, eles podem iniciar suas funções de proteção ou eliminar os radicais livres, ou reagir diretamente com O<sub>3</sub>, diminuindo assim o conteúdo de polifenóis em amostras de alimentos (ALOTHMAN *et al.*, 2010). Entretanto, os resultados do presente trabalho não indicam uma associação entre a degradação dos compostos fenólicos e a ozonização, uma vez que esta tendência ocorreu em todos os tratamentos, contudo, de forma menos gradativa em frutos ozonizados. Os efeitos dos tratamentos das amostras avaliadas sobre a atividade enzimática da fenilalanina amônioliase (PAL), polifenol oxidase (PPO) e peroxidase (POD) encontram-se na Figura 6.

Houve interação ( $p < 0,05$ ) entre os fatores tratamentos e tempo de armazenamento apenas para a enzima POD. Após o desdobramento da interação, detectou-se diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos para os dias 9 e 12. No último dia de armazenamento, frutos tratados com a maior concentração de água ozonizada (Oz<sub>1.0</sub>) apresentaram maior atividade da enzima POD quando comparado ao tratamento com água clorada (26,95±0,74 e 22,96±0,30 U g<sup>-1</sup>, respectivamente).

A atividade da POD variou durante o armazenamento. O maior aumento ocorreu do 1º ao 3º dia, de 14,54 a 16,08 U g<sup>-1</sup>, seguida de queda e um ligeiro aumento para 14,25 U g<sup>-1</sup> no final do período de armazenamento (Figura 4). O aumento nos primeiros 3 dias pode, provavelmente, ser explicado pela resposta ao corte dos morangos minimamente processados. A morte do tecido na área do corte elevou a atividade da peroxidase das células próximas para reparar o tecido ferido. O aumento posterior no 12º dia pode ser atribuído ao amadurecimento de cada fruta em particular.



**Figure 6** - Enzymatic activity of minimally processed strawberries, as a function of storage time in a refrigerated chamber, regardless of treatments\*.

\*Each point on the graph represents the mean of treatments. Means of standard deviation ( $\pm$ SD) are represented by error bars of three replicates (n) for each treatment.

**Figura 6** - Atividade enzimática de morangos minimamente processados, em função do tempo de armazenamento em câmara de refrigeração, independentemente dos tratamentos\*.

\*Cada ponto do gráfico representa a média dos tratamentos. As médias de desvio padrão ( $\pm$ S.D.) são representadas por barras de erro de três réplicas (n) para cada tratamento.

In summary, the maintenance of cellular integrity in fruit is reflected in lower activity of oxidizing enzymes (peroxidase and polyphenol oxidase), resulting in a lower browning index, which can be attributed in part to the lower possibility of contact of enzymes with substrates and to the lower availability of phenolic compounds. A lower rate of enzymatic activity in minimally processed products implies less potential for deterioration of tissues' sensory characteristics, thus avoiding the loss of quality attributes (color and firmness) and prolonging shelf life (LIMA *et al.*, 2002). This pattern was observed in the present study.

The enzymatic activity of PPO and PAL showed no interaction between treatment x days of storage. The activity of PPO and PAL remained stable throughout storage ( $p > 0.05$ ), ranging from 37.99 to 27.98 U g<sup>-1</sup> of fresh matter for PPO and 5.89 to 6.52 U g<sup>-1</sup> of fresh matter for PAL (Figure 4).

Em síntese, a manutenção da integridade celular na fruta se reflete na menor atividade das enzimas oxidantes (peroxidase e polifenol oxidase), resultando em um menor índice de escurecimento, que pode ser atribuído em parte à menor possibilidade de contato das enzimas com substratos e à menor disponibilidade de compostos fenólicos. Uma menor taxa de atividade enzimática em produtos minimamente processados implica menor potencial de deterioração das características sensoriais do tecido, evitando assim a perda dos atributos de qualidade (cor e firmeza) e prolongando a vida útil (LIMA *et al.*, 2002) danos mecânicos e podridões. Este padrão foi observado no presente estudo.

A atividade enzimática da PPO e PAL não apresentaram interação entre os fatores tratamento x dias de armazenamento. A atividade das enzimas PPO e PAL mantiveram-se estáveis ao longo do armazenamento ( $p < 0,05$ ), variando de 37,99 a 27,98 U g<sup>-1</sup> de matéria fresca, para a PPO e 5,89 a 6,52 U g<sup>-1</sup> de matéria fresca, para a PAL (Figura 4).

According to An *et al.* (2007), PAL production can be stimulated by abiotic stress, injuries caused by cutting or stress caused by pathogen infections. Studies carried out by the authors, after minimal processing of asparagus, verified an increase in PAL activity in the first 10 days of storage, followed by a decrease over 25 days.

Asparagus treated with aqueous ozone ( $0.001 \text{ g L}^{-1}$ ) showed lower PAL activity compared to untreated groups, so ozone treatment inhibited the increase in PAL activity. Also according to the authors, the response of the fruit in defense to the treatment was due to the generation of free radicals, which in turn triggered secondary metabolism by activating PAL. Therefore, fungal infection may have induced the defense mechanism, thus stimulating PAL synthesis (SAUTTER *et al.*, 2011). However, in the present study, PAL induction was not observed in strawberries submitted to the studied sanitation processes.

### Incidence of pathogens

The evaluation of the incidence of pathogens in minimally processed strawberries was performed through visual detection of diseases caused by fungi during 10 days of storage. There was interaction ( $p \leq 0.05$ ) between treatments and storage time. From day 4, the observations of lesions arising from pathogenic contamination in minimally processed strawberries began, but differences ( $p \leq 0.05$ ) were detected between treatments on day 8, when treatments with aqueous ozone were responsible for lower incidence of pathogens (Table 6).

Sanitization of minimally processed strawberries by treatment with ozonized water ( $Oz_{0.2}$ ;  $Oz_{0.5}$  and  $Oz_{1.0}$ ) and chlorine were efficient in delaying the appearance of fungi during storage until day 4.

De acordo com An *et al.* (2007) antioxidant enzyme activities and cell wall compositions of fresh-cut green asparagus. (*Asparagus officinalis* L., a PAL pode ser estimulada por estresse abiótico, injúrias causadas por corte ou estresses por infecções de patógenos. Estudos realizados pelos autores, após processamento mínimo de aspargos, verificaram aumento da atividade de PAL nos primeiros 10 dias de armazenamento, seguidos de queda ao longo de 25 dias.

Os espargos tratados com ozônio aquoso ( $0,001 \text{ g L}^{-1}$ ), mostraram menor atividade da PAL em relação aos grupos sem tratamento, portanto, o tratamento com ozônio inibiu o aumento da atividade PAL. Ainda, segundo os autores, a resposta da fruta em defesa ao tratamento se deu pela geração de radicais livres, que por sua vez, desencadeou o metabolismo secundário pela ativação da PAL. Portanto, a infecção por fungos pode ter induzido o mecanismo de defesa, estimulando assim a síntese da PAL (SAUTTER *et al.*, 2011). Contudo, no presente estudo, a indução da PAL não foi observada nos morangos submetidos aos processos de sanitização estudados.

### Incidência de patógenos

A avaliação da incidência de patógenos em morangos minimamente processados foi realizada por meio da detecção visual de doenças causadas por fungos durante 10 dias de armazenamento. Houve interação ( $p \leq 0,05$ ) entre os fatores tratamentos e tempo de armazenamento. A partir do dia 4, iniciou-se as observadas das lesões oriundas de contaminação patogênica nos morangos minimamente processados, porém, detectou-se diferenças ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos no dia 8, quando os tratamentos com ozônio aquoso foram responsáveis por menores índices de incidência de patógenos (Tabela 6).

A higienização dos morangos minimamente processados tratados com água ozonizada ( $Oz_{0.2}$ ;  $Oz_{0.5}$  e  $Oz_{1.0}$ ) e cloro foram eficientes em retardar o aparecimento de fungos durante o armazenamento até a 4º dia.

**Table 6** - Effect of treatments with chlorinated water and aqueous O<sub>3</sub> on the incidence of decomposition (%) during storage of minimally processed strawberries for 10 days at 5 °C**Tabela 6** - Efeito dos tratamentos com água clorada e O<sub>3</sub> aquoso na incidência de decomposição (%) durante o armazenamento de morangos minimamente processados por 10 dias a 5 °C

Treatments	Storage Time (days)*				
	0	3	6	9	12
Oz <sub>0.2</sub>	0.00±0.00 <sup>aC</sup>	6.25±7.22 <sup>aC</sup>	25.00±14.43 <sup>bB</sup>	100±0.00 <sup>aA</sup>	5.99±1.82 <sup>aA</sup>
Oz <sub>0.5</sub>	0.00±0.00 <sup>aC</sup>	6.25±12.50 <sup>aC</sup>	25.00±10.21 <sup>bB</sup>	100±0.00 <sup>aA</sup>	7.45±1.36 <sup>aA</sup>
Oz <sub>1.0</sub>	0.00±0.00 <sup>aB</sup>	6.25±7.22 <sup>aB</sup>	15.625±23.66 <sup>bB</sup>	100±0.00 <sup>aA</sup>	7.03±1.14 <sup>aA</sup>
Chlorine	0.00±0.00 <sup>aC</sup>	12.5±10.21 <sup>aC</sup>	31.25±12.50 <sup>abB</sup>	100±0.00 <sup>aA</sup>	5.50±0.69 <sup>aA</sup>
Control	3.13±6.25 <sup>aCD</sup>	18.75±19.09 <sup>aC</sup>	59.375±6.25 <sup>aB</sup>	100±0.00 <sup>aA</sup>	8.43±1.41 <sup>aA</sup>
<b>General Mean</b>	<b>0.63±2.80</b>	<b>10.29±11.89</b>	<b>31.25±20.07</b>	<b>100±0.00</b>	<b>6.88±1.17</b>

\* Values represent the mean (±SD) of three replicates (n). Means followed by the same lowercase letters in the column and uppercase letters in the row do not differ significantly by the Tukey test ( $p > 0.05$ ).

\* Os valores representam a média (±D.P.) de três repetições (n). As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não apresentam diferença significativa pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

The contamination rate in strawberries increased exponentially towards the end of the experimental period, but sanitization with aqueous ozone was effective in delaying the visible growth of postharvest fungi during storage for 8 days, with significantly lower incidence of pathogens. Over the 12-day storage period, the contamination of fruits in the Control treatment was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) from day 4 onwards, emphasizing the importance of sanitization to maintain control postharvest microbiology. It is also important to highlight that on the 10th day of analysis, 100% of the fruits were already contaminated, possibly due to excessive handling during the experimental period.

The action of O<sub>3</sub> in controlling fungal growth may have occurred due to its direct effect, inactivating fungi through its reaction with intracellular enzymes, nucleic acids and unsaturated lipids of fungi (KHADRE *et al.*, 2001). Many studies have reported the effect of O<sub>3</sub> on the control of postharvest diseases. Aday and Caner (2014) observed a reduction of *Botrytis cinerea* in strawberries after sanitization with aqueous ozone, while Costa *et al.* (2011) reported reduced mycelial growth of *B. cinerea* in strawberries treated with aqueous ozone (1.5 µL L<sup>-1</sup> of O<sub>3</sub>) and stored at 2 °C for 3 days and then maintained at 20 °C.

O índice de contaminação em morangos aumentou exponencialmente até o final do período experimental, mas a sanitização com ozônio aquoso foi eficaz em retardar o crescimento visível de fungos pós-colheita durante o armazenamento por 8 dias, com incidência significativamente menor de patógenos sobre o controle. Ao analisar o comportamento das amostras ao longo do tempo de armazenamento, foi possível observar que a contaminação dos frutos provenientes do tratamento controle foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) a partir do dia 4, enfatizando a importância da sanitização para manutenção do controle microbiológico na pós-colheita. É importante destacar que no 10º dia de análise 100% dos frutos já se encontravam contaminados, possivelmente devido à manipulação excessiva da fruta durante o período experimental.

A ação do O<sub>3</sub> no controle do crescimento fúngico pode ter ocorrido por seu efeito direto, inativando os fungos por sua reação com enzimas intracelulares, ácidos nucleicos e lipídios insaturados dos fungos (KHADRE *et al.*, 2001) hydroxyl radical. Muitos estudos na literatura relataram o efeito do O<sub>3</sub> no controle das doenças pós-colheita. Aday e Caner (2014) observaram redução de *Botrytis cinerea* em morangos após sanitização com ozônio aquoso, enquanto Costa *et al.* (2011) relataram redução do crescimento de micélio de *B. cinerea* em morangos tratados com ozônio aquoso (1,5 µL L<sup>-1</sup> de O<sub>3</sub>) e armazenados a 2 °C durante 3 dias e depois mantidos a 20 °C.



Sautter *et al.* (2011) found that the application of ozone gas ( $0.03 \mu\text{L L}^{-1}$  of  $\text{O}_3$ ) controlled the spread of lesions caused in peaches by *Monilinia fructicola* during storage for 30 days. Alencar *et al.* (2013) demonstrated reduced incidence of *Colletotrichum musae* in bananas (cv. Nanicão) by treatment with ozone and reported that the aqueous application was more efficient than the gaseous form, not only in reducing fungal growth, but also in preserving the postharvest sensory characteristics. Alexandre *et al.* (2012) reported that washing with ozonated water combined with blanching was efficient in controlling spoilage microorganisms in red peppers, strawberries and watercress.

Contigiani *et al.* (2018) evaluated the reduction of native mycobiota in strawberries “Albion” after washing with ozonized water for different periods, at a concentration of  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$ . The authors observed that sanitization in ozonated water for 5 minutes reduced the incidence of native fungi on the fruits by 22% after 12 days of storage, compared to the control fruits. A two-day delay in the onset of *Botrytis cinerea* infection was also observed in these treatments. However, aqueous ozone washing for 15 minutes was associated with earlier signs of infection, although still showing a higher percentage of infected fruit than in the control treatment fruit during storage.

In the present study, the isolated microorganisms were identified based on the morphological and microscopic characteristics of the colonies, at least to the genus level. The main fungi identified as responsible for postharvest rot were *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus sp.*, and *Botrytis cinerea*.

## CONCLUSIONS

The sanitation methods studied were effective in maintaining the quality parameters of minimally processed strawberries “Camino Real”;

Treatment with ozonated water, regardless of concentration, had no adverse effect on fruit quality;

Sautter *et al.* (2011) descobriram que a aplicação de gás ozônio ( $0,03 \mu\text{L L}^{-1}$  de  $\text{O}_3$ ) controlou a propagação de lesões causadas em pêssegos por *Monilinia fructicola* durante o armazenamento por 30 dias. Alencar *et al.* (2013) demonstraram incidência reduzida de *Colletotrichum musae* em bananas (cv. Nanicão) pelo tratamento com ozônio e relataram que a aplicação de forma aquosa foi mais eficiente do que a forma gasosa, não apenas na redução do crescimento fúngico, mas também na preservação das características sensoriais pós-colheita. Alexandre *et al.* (2012) relataram que a lavagem com água ozonizada combinada com branqueamento foi eficiente em controlar microrganismos deteriorantes em pimentas vermelhas, morangos e agriões.

Contigiani *et al.* (2018) avaliaram a redução de microbiota nativa em morangos, cv. Albion, após lavagem com água ozonizada para diferentes momentos, a uma concentração de  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Os autores observaram que frutas higienizadas em água ozonizada por 5 minutos reduziram a incidência de fungos nativos em 22% após 12 dias de armazenamento, em comparação com frutas controle. Um atraso de 2 dias no início da infecção por *Botrytis cinerea* também foi observado nesses tratamentos. Entretanto, a lavagem com ozônio aquoso por 15 minutos mostrou sinais anteriores de infecção, mostrando, ainda, uma porcentagem maior de frutas infectadas do que as frutas dos tratamentos de controle durante o armazenamento.

No presente estudo, os microrganismos isolados foram identificados com base nas características morfológicas e microscópicas das colônias até, pelo menos, o nível do gênero. Os principais fungos identificados, como responsáveis pela podridão pós-colheita, foram *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizopus sp.* e *Botrytis cinerea*.

## CONCLUSÕES

Os métodos de sanitização estudados são eficazes na manutenção dos parâmetros de qualidade dos morangos, cv. Camino Real, minimamente processados;

O tratamento com água ozonizada, independentemente da concentração, não apresenta efeito adverso sobre a qualidade dos frutos;

Treatments with ozonized and chlorinated water were effective in reducing the incidence of pathogens responsible for reducing the shelf life of minimally processed strawberries;

Sanitization reduced the incidence of contamination over a longer storage period;

The reduced sanitization time and efficiency of ozonized water make this sanitization process attractive to the food processing industry.

Os tratamentos com água ozonizada e clorada são eficazes em reduzir a incidência de patógenos responsáveis por diminuir a vida útil de morangos minimamente processados;

A sanitização reduz a incidência de contaminação em morangos minimamente processados por um período de armazenamento mais longo;

O tempo reduzido de higienização e eficiência da água ozonizada tornam esse processo de sanitização atraente para a indústria de processamento de alimentos.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was partially funded by the Office to Coordinate the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, finance code 001) and by the Research Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ: E-26/202.186/2020; E-26/201.302/2022).

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e pela Fundação de Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ: E-26/202.186/2020; E-26/201.302/2022).

## CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- ADAY, M. S.; CANER, C. Individual and combined effects of ultrasound, ozone and chlorine dioxide on strawberry storage life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 344-351, 2014. Elsevier Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.006>
- ADAY, M. S.; TEMIZKAN, R.; BÜYÜKCAN, M. B.; CANER, C. An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound. **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 93-101, 2013. orange life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 344-351, 2014. Elsevier Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.09.013>
- ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D. A.; PINTO, M. DA S.; DA COSTA, A. R.; DA SILVA, T. A. Postharvest quality of ozonized “nanicão” cv. Bananas. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 1, p. 107-114, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902013000100014>
- ALEXANDRE, E. M. C.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 3, p. 417-426, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.002>
- ALLENDE, A.; MARÍN, A.; BUENDÍA, B.; TOMÁS-BARBERÁN, F.; GIL, M. I. Impact of combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O<sub>3</sub>, superatmospheric O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub>) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 201-211, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.05.007>
- ALOTHMAN, M.; KAUR, B.; FAZILAH, A.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 666-671, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2010.08.008>
- AN, J.; ZHANG, M.; LU, Q. Changes in some quality indexes in fresh-cut green asparagus pretreated with aqueous ozone and subsequent modified atmosphere packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 1, p. 340-344, 2007.
- ASLAM, R.; ALAM, M. S.; SINGH, S.; KUMAR, S. Aqueous ozone sanitization of whole peeled onion: Process optimization and evaluation of keeping quality during refrigerated storage. **Lwt**, v. 151, p. 112183, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112183>
- ÁVILA, J. M. M. DE; TORALLES, R. P.; CANTILLANO, R. F. F.; PERALBA, M. DO C. R.; PIZZOLATO, T. M. Influência do sistema de produção e do armazenamento refrigerado nas características físico-químicas e no desenvolvimento de compostos voláteis em morangos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2265-2271, 2012.
- CAMPOS, Â. D.; SILVEIRA, E. M. D. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. 2003.
- CHAUHAN, O. P.; RAJU, P. S.; RAVI, N.; SINGH, A.; BAWA, A. S. Effectiveness of ozone in combination with controlled atmosphere on quality characteristics including lignification of carrot sticks. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 1, p. 43-48, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.033>
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2<sup>o</sup> ed ed. Lavras, 2005.
- COELHO, C. C. DE S.; FREITAS-SILVA, O.; ALCANTARA, I.; SILVA, J. P. L. DA; CABRAL, L. M. C. Ozônio em morangos minimamente processados, uma alternativa ao uso do cloro na segurança de alimentos. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 3, n. 1, p. 61-66, 2015. Disponível em: <<http://www.visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/437/186>>. .

- CONTIGIANI, E. V.; JARAMILLO-SÁNCHEZ, G.; CASTRO, M. A.; GÓMEZ, P. L.; ALZAMORA, S. M. Postharvest Quality of Strawberry Fruit (*Fragaria x Ananassa Duch* cv. Albion) as Affected by Ozone Washing: Fungal Spoilage, Mechanical Properties, and Structure. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 9, p. 1639-1650, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-018-2127-0>
- CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; LAJOLO, F. M. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 167-173, 2003. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00059-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00059-1)
- COSTA, F. B.; DUARTE, P. S.; PUSCHMANN, R.; FINGER, F. L. Quality of fresh-cut strawberry. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 477-484, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362011000400006>
- FARDET, A. Characterization of the Degree of Food Processing in Relation With Its Health Potential and Effects. In: F. Toldrá (Org.); **Advances in Food and Nutrition Research**. 1º ed, v. 85, p.79-129, 2018. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.002>>. DOI: <http://dx.doi.org/>
- FORNEY, C. F.; SONG, J.; HILDEBRAND, P. D.; FAN, L.; MCRAE, K. B. Interactive effects of ozone and 1-methylcyclopropene on decay resistance and quality of stored carrots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 341-348, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/>
- FREITAS-SILVA, O.; MORALES-VALLE, H.; VENÂNCIO, A. Potential of Aqueous Ozone to Control Aflatoxigenic Fungi in Brazil Nuts. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1-6, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/isrn/biotechnology/2013/859830/%5Cnhttp://www.hindawi.com/journals/isrn/biotechnology/2013/859830/>>. DOI: <http://dx.doi.org/>
- GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; AMIOT, M. J. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1370-1373, 2005. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf048396b>>. DOI: <http://dx.doi.org/>
- GILLER, G.; SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995.
- GLOWACZ, M.; COLGAN, R.; REES, D. Influence of continuous exposure to gaseous ozone on the quality of red bell peppers, cucumbers and zucchini. **Postharvest Biology and Technology**, v. 99, p. 1-8, 2015. Elsevier B.V. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.06.015>>. .
- HYODO, H.; KURODA, H.; SHANG, A.; YANG, F. Induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Increase in Phenolics in Lettuce Leaves in Relation to the Development of Russet Spotting Caused by Ethylene1. **Plant Physiol**, v. 62, p. 31-35, 1978.
- ISO 1842. Fruit and Vegetable Products. Determination of pH. **International Organization for Standardization**, v. Segunda ed, 1991.
- ISO 750. Fruit and Vegetable Products. Determination of Titrable Acidity. **International Organization for Standardization**, v. Segunda ed, 1998.
- 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. DOI: <http://dx.doi.org/>
- LANGEBARTELS, C.; WOHLGEMUTH, H.; KSCHIESCHAN, S.; GRÜN, S. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 567-575, 2002.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and Postharvest factors influencing vitamin C content of horticulture crops. **Postharvest Biology and Technology**, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.

- LIMA, M. A. C. DE; ALVES, R. E.; ASSIS, J. S. DE; FILGUEIRAS, H. A. C.; COSTA, J. T. A. Aparência, compostos fenólicos e enzimas oxidativas em uva “Itália” sob influência do cálcio e do armazenamento refrigerado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 39-43, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/>
- MATTIUZ, B.-H.; MIGUEL, A. C. A.; NACHTIGAL, J. C.; DURIGAN, J. F.; CAMARGO, U. A. Processamento mínimo de uvas de mesa sem semente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, p. 226-229, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/>
- MENDOZA, I. C.; LUNA, E. O.; POZO, M. D.; VÁSQUEZ, M. V.; MONTOYA, D. C.; MORAN, G. C.; ROMERO, L. G.; YÉPEZ, X.; SALAZAR, R.; ROMERO-PEÑA, M.; LEÓN, J. C. Conventional and non-conventional disinfection methods to prevent microbial contamination in minimally processed fruits and vegetables. **LWT- Food Science and Technology**, v. 165, n. June, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113714>
- MONACO, K. A.; COSTA, S. M.; MINATEL, I. O.; CORREA, C. R.; CALERO, F. A.; VIANELLO, F.; Lima, G. P. P. Influence of ozonated water sanitation on postharvest quality of conventionally and organically cultivated mangoes after postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 120, p. 69-75, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.003>
- MORAES, I. V. M. D.; CENCI, S. A.; BENEDETTI, B. C.; MAMEDE, A. M. G. N.; SOARES, A. G.; BARBOZA, H. T. G. Características físicas e químicas de morango processado minimamente e conservado sob refrigeração e atmosfera controlada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 274-281, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200003>
- NADAS, A.; OLMO, M.; GARCÍA, J. M. Growth of *Botrytis cinerea* and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 5, p. 1798-1802, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12332.x>
- PÉREZ, A. G.; SANZ, C.; RÍOS, J. J.; OLÍAS, R.; OLÍAS, J. M. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p.1652-1656, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf980829l>
- PINHEIRO, N. M. DE S.; FIGUEIREDO, E. A. T. DE; FIGUEIREDO, R. W. DE; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M. DE. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 153-156, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452005000100040>
- REIS, K. C. DOS; SIQUEIRA, H. H. DE; ALVES, A. DE P.; SILVA, J. D.; LIMA, L. C. DE O. Efeito de diferentes sanificantes sobre a qualidade de morango cv. Oso Grande. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 196-202, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000100029>
- RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.
- ROSA, J. S. DA; GODOY, R. L. DE O.; OIANO NETO, J.; CAMPOS, R. S.; MATTA, V. M.; FREIRE, C. A.; SILVA, A. S.; SOUZA, R. S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 837-846, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400025>
- SAUTTER, C. K.; BRACKMANN, A.; ANESE, R. DE O.; WEBER, A.; RIZZATTI, M. R.; PAVANELLO, E. P. Controle da podridão-parda e características físico-químicas de pêssegos “Magnum” submetidos a tratamentos pós-colheita com elicitores abióticos. **Revista Ceres**, v. 58, n. 2, p. 172-177, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000200007>

SHWARTZ, E.; GLAZER, I.; BAR-YA'AKOV, I.; MATITYAHU, I.; BAR-ILAN, I.; HOLLAND, D.; AMIR, R. Changes in chemical constituents during the maturation and ripening of two commercially important pomegranate accessions. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 965-973, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.036>

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SISTRUNK, W. A.; MORRIS, J. R. Storage Stability of Strawberry Products Manufactured from Mechanically-harvested Strawberries1. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 103, n. 5, p. 616-620, 1978.

SOUZA, L. P. DE; FARONI, L. R. D. A.; HELENO, F. F.; CECON, P. R.; GONÇALVES, T. D. C.; SILVA, G. J.; PRATES, L. H. F. Effects of ozone treatment on postharvest carrot quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 53-60, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.057>

SPAYD, S. E.; MORRIS, J. R. Effects of Immature Fruit and Holding on Strawberry Puree Quality and Color Stability. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 106, n. 2, p. 211-216, 1981.

SRIPONG, K.; UTHAIRATANAKIJ, A.; JITAREERAT, P. Impact of gaseous ozone on microbial contamination and quality of fresh-cut durian. **Scientia Horticulturae**, v. 294, p. 110799, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110799>

TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P. J. Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1119-1126, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.085>. .

TROYO, R. D.; ACEDO JR., A. L. Effects of calcium ascorbate and calcium lactate on quality of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*). **International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences**, v. 3, n. 1, p. 143-150, 2019.

YEOH, W. K.; ALI, A.; FORNEY, C. F. Effects of ozone on major antioxidants and microbial populations of fresh-cut papaya. **Postharvest Biology and Technology**, v. 89, p. 56-58, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.11.006>