

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Estudo da Impregnação a Vácuo de Trealose como Crioprotetor em Morangos**

- Dissertação de Mestrado-

Nicole Luíse Froehlich Kunsler

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Estudo da Impregnação a Vácuo de Trealose como Crioprotetor em Morangos

Nicole Luíse Froehlich Kunsler

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Engenharia.  
Área de concentração: Fenômenos de Transporte

**Orientadoras:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ligia Damasceno Ferreira Marczak**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Schilling Cassini**

Porto Alegre

2017

## ***Agradecimentos***

*Às minhas orientadoras Ligia e Aline, sempre dispostas e atenciosas, pelo estímulo, paciência e compreensão.*

*Aos professores, técnicos e funcionários do DEQUI pelo auxílio.*

*Ao Programa de Pós Graduação e ao Departamento de Engenharia Química pela utilização da estrutura física dos laboratórios.*

*Aos colegas de Pós-Graduação pela convivência, amizade e auxílio.*

*A toda minha família, em especial minha mãe, minhas tias e meus sogros pelo incentivo e auxílio principalmente com a minha pequena Maria Eduarda nos momentos da minha ausência.*

*Ao meu marido, Adriano, pelo auxílio, incentivo e companheirismo.*

*À minha filha, Maria Eduarda, pelo amor, carinho e compreensão.*

*À Johann Alimentos, em especial ao Sr. Rosalvo, por permitir a minha ausência para a realização deste trabalho.*

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Estudo da Impregnação a Vácuo de Trealose como Crioprotetor em Morangos*, elaborada por Nicole Luíse Froehlich Kunsler, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Poliana Deise Gurak

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Débora Jung Luvizetto Faccin

---

Pesquisadora Dr.<sup>a</sup> Patrícia Benelli

## Resumo

Embora o congelamento apresente vantagens em relação a outros métodos de conservação de alimentos, o mesmo causa alterações sensoriais, principalmente em produtos de origem vegetal. O morango, uma fruta muito apreciada e com formas variadas de consumo, tem comportamento sazonal e apresenta como fator limitante para o congelamento sua estrutura frágil e sensível ao processo, o que causa alterações sensoriais. Tais alterações podem ser minimizadas com a incorporação de crioprotetores, como a trealose, um dissacarídeo que vem se destacando pelo seu efeito crioprotetor em produtos congelados e desidratados. O principal objetivo deste trabalho foi verificar o efeito crioprotetor da trealose incorporada através da impregnação a vácuo em soluções de diferentes concentrações (100, 300 e 500 g/L) em morangos submetidos ao congelamento e descongelamento. As condições de impregnação foram de 5 min, aplicando pressão de -650 mmHg e 10 min de tempo de relaxamento. As alterações provocadas pelo processo de impregnação bem como a verificação do efeito crioprotetor da trealose foram identificadas através de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography- HPLC*), análise colorimétrica, análise de textura, determinação do teor de sólidos solúveis, determinação do teor de umidade e perda de massa (perda por gotejamento). Os resultados mostraram que a concentração da solução de trealose exerce influência significativa no teor de umidade, teor de sólidos solúveis e teor de trealose. As amostras tratadas com soluções mais concentradas não sofreram desidratação após descongelamento. O teor de trealose, após descongelamento, permaneceu constante em todas as amostras tratadas. Todas as amostras tiveram a mesma perda de massa após descongelamento (perda por gotejamento), porém a composição da massa diferiu entre elas. Amostras tratadas com a solução mais concentrada perderam sólidos enquanto que as amostras tratadas com a menos concentrada, perderam água. Na análise de textura, a introdução da trealose não influenciou a força máxima de pico nas amostras impregnadas. Após descongelamento, todas as amostras, exceto a tratada com solução de 500 g/L, sofreram amolecimento. A parte externa dos morangos não sofreu alterações de cor devido à introdução da trealose nem devido ao congelamento e descongelamento. Na parte interna dos frutos, ocorreram variações no parâmetro  $L^*$  devido à impregnação e no parâmetro  $b^*$ , devido ao congelamento e descongelamento.

**Palavras-chave:** morango, trealose, crioprotetor, impregnação a vácuo.

## Abstract

Although freezing offers advantages to others food conservations process, it causes sensorial changes, mostly in vegetables products. The strawberry, a quite appreciated fruit, shows different ways of use, has seasonal behavior and is limited to freezing due the sensorial changes caused by its fragile structure to freezing process. These sensorial changes can be minimized by the incorporation of cryoprotectors, as trehalose, that is known by its cryoprotector effect during freezing and dehydration. The aim of this work was to verify the trehalose cryoprotector effect in frozen and thawed strawberries introduced by vacuum impregnation with different solutions (100, 300 and 500 g/L). The impregnation conditions were 5 min of applying pressure of -650 mmHg and after atmospheric pressure was restored, the sample was maintained within the solution for 10 min (these conditions were obtained from previous experiments). The alterations caused by the vacuum impregnation and the verification of the cryoprotector effect of trehalose were identified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), color analysis, texture analysis, soluble solids content, moisture content and drip loss. The results have shown that concentration of the trehalose solution had a significant influence on the moisture content, soluble solids and trehalose content of impregnated strawberries. The samples treated with more concentration solutions did not dehydrated after thawing. The trehalose content was the same in all treated samples after thawing. All the samples showed the same drip loss due to thawing although the composition of the mass was different among the samples. Samples treated with the most concentration solution lost trehalose while the sample treated with the least concentration solutions lost water. The introduction of trehalose did not affect the maximum peak force of the impregnated samples. The freezing and the thawing process caused the softening of the samples. This effect was not observed on the sample treated with solution of 500 g/L. The introduction of trehalose did not cause significant differences in all color parameters measured on the outside of the strawberries after impregnation and thawing. In the inside of the samples, there were variation in the  $L^*$  parameter caused by the vacuum impregnations and in the  $b^*$  parameter caused by the freezing and thawing process.

**Keywords:** strawberry, trehalose, cryoprotector, vacuum impregnation.

# Sumário

Capítulo 1- Introdução.....	1
Capítulo 2- Objetivos .....	4
Capítulo 3- Revisão Bibliográfica e Fundamentos Teóricos.....	5
3.1 O Morango .....	5
3.1.1 Características Botânicas e Físico- químicas do Morango.....	5
3.1.2 Aspectos Econômicos.....	9
3.2 Alimentos Congelados .....	10
3.2.1 Aspectos Econômicos.....	10
3.2.2 Congelamento de Alimentos .....	12
3.2.3 Descongelamento de Alimentos .....	18
3.2.4 Alterações Causadas pelo Congelamento nos Alimentos .....	19
3.3 Os Crioprotetores .....	25
3.3.1 Tipos de Crioprotetor e Mecanismos de Ação .....	25
3.3.2 A Trealose .....	29
3.4 Impregnação a Vácuo .....	38
Capítulo 4- Materiais e Métodos .....	50
4.1 Matérias-primas.....	50
4.1.1 Morangos.....	50
4.1.2 Trealose .....	52
4.2 Tratamentos .....	54
4.2.1 Testes Preliminares.....	55
4.2.2 Impregnação a Vácuo .....	58
4.2.3 Congelamento.....	60
4.2.4 Descongelamento .....	61
4.3 Avaliação do Poder Crioprotetor da Trealose em Morangos .....	61
4.3.1 Variação de Massa após Descongelamento (Perda por Gotejamento).....	61
4.3.2 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis .....	62
4.3.3 Determinação do Teor de Umidade e Substâncias Voláteis.....	62
4.3.4 Determinação do Teor de Trealose .....	63
4.3.5 Análise Colorimétrica.....	64
4.3.6 Análise de Textura.....	65
4.3.7 Análise Estatística .....	65
Capítulo 5- Resultados e Discussão .....	66
5.1 Propriedades das Soluções de Trealose.....	66
5.1.1 Massa Específica .....	66

5.1.2	Viscosidade Dinâmica.....	67
5.2	Resultados da Impregnação a Vácuo em Morangos .....	68
5.2.1	Testes Preliminares.....	68
5.2.2	Avaliação da Impregnação a Vácuo das Soluções de Trealose em Morangos Cortados pela Metade .....	77
5.3	Avaliação do Efeito Crioprotetor da Trealose em Morangos.....	83
Capítulo 6-	Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros.....	97
Referências	.....	100
Apêndice A	.....	110



## Lista de Figuras

Figura 3.1- Morfologia do morango e do morangueiro.....	6
Figura 3.2- Mudanças na composição de um alimento durante congelamento onde T é a temperatura e $T_c$ é a temperatura de congelamento. ....	13
Figura 3.3- Curva de congelamento típica de um alimento.....	15
Figura 3.4- Curvas de congelamento de um alimento em processo lento e rápido. ....	16
Figura 3.5- Processo de congelamento em um alimento. ....	17
Figura 3.6- Comparação entre o processo de descongelamento e congelamento lento de um alimento. ....	19
Figura 3.7- Efeito do congelamento lento e rápido nas células vegetais onde (a) representa o efeito de congelamento lento e (b) rápido nas células. ....	21
Figura 3.8- Taxa de crescimento microbiano em função da temperatura de estocagem de alimentos congelados.....	25
Figura 3.9- Estrutura química da trealose.....	29
Figura 3.10- Ciclo de síntese e degradação da trealose na natureza.....	31
Figura 3.11- Síntese de trealose a partir do amido. ....	32
Figura 3.12- Esquema da obtenção de trealose a partir de oligossacarídeos.....	32
Figura 3.13- Esquema do mecanismo de ação da trealose durante perda e ganho de água. ....	34
Figura 3.14- Interação da trealose com a estrutura tetraédrica da água. ....	35
Figura 3.15- Perda de água de maçã durante os processos de desidratação osmótica sob pressão atmosférica (50A) e sob vácuo (50V).....	39
Figura 3.16- Mecanismos de transferência de massa durante impregnação a vácuo. ....	40
Figura 4.1- Amostra de morangos utilizada nos ensaios. ....	51
Figura 4.2- Amostra preparada para ensaio preliminar de impregnação.....	51
Figura 4.3- Fluxograma do processo de verificação da eficácia da trealose como crioprotetor em morangos.....	55
Figura 4.4- Sistema de impregnação a vácuo utilizado nos ensaios.....	58
Figura 5.1- Amostras impregnadas com solução de azul de metileno sob vácuo de -250 mmHg, tempo de relaxamento de 1 min e tempos de impregnação de (a) 1 min e (b) 10 min.....	70

Figura 5.2- Amostras impregnadas com solução de azul de metileno sob pressão de -650 mmHg, tempo de impregnação de 1 min e tempos de relaxamento de (a) 1 min e (b) 10 min. ....	71
Figura 5.3- Amostras impregnadas com solução de azul de metileno com tempos de impregnação e de relaxamento de 10 min cada e sob pressão de vácuo de (a) -250 e (b) - 650 mm Hg. ....	73
Figura 5.4- Morangos submetidos aos tratamentos (a) 1, (b) 2, (c) 3 e (d) 4 do segundo planejamento.....	76
Figura 5.5- Solução de trealose após processo de impregnação a vácuo. ....	80
Figura 5.6- Comparação entre morangos <i>in natura</i> e morangos impregnados com solução de trealose a (a) 100g/L, (b) 300 g/L e (c) 500 g/L sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min. ....	83
Figura 5.7- Variação de massa das amostras após descongelamento de amostras impregnadas com soluções de 100, 300 e 500 g/L com pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min.....	84
Figura 5.8- Teor de sólidos solúveis nas amostras antes e após descongelamento.....	85
Figura 5.9- Teor de trealose nas amostras antes e após descongelamento.....	86
Figura 5.10- Teor de umidade das amostras antes e após descongelamento.....	87
Figura 5.11- Força máxima de pico nas amostras antes e depois descongelamento. ....	89
Figura 5.12- Valores dos parâmetros (a) $L^*$ , (b) $a^*$ e (c) $b^*$ da face interna dos morangos antes e após descongelamento. ....	91
Figura 5.13- Valores dos parâmetros (a) $L^*$ , (b) $a^*$ e (c) $b^*$ da face externa dos morangos antes e após descongelamento. ....	92
Figura 5.14- Valores dos parâmetros (a) <i>Hue</i> e (b) <i>Croma</i> da face interna dos morangos antes e após descongelamento. ....	93
Figura 5.15- Valores dos parâmetros (a) <i>Hue</i> e (b) <i>Croma</i> da face externa dos morangos antes e após descongelamento. ....	94
Figura 5.16 - Diagrama que relaciona os parâmetros dos espaço CIELAB.....	95
Figura 5.17- Morangos (a) sem tratamento, tratados com solução a (b) 100 g/L, (c) 300 g/L e (d) 500 g/L sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min, após descongelamento.....	96

## Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Classificação dos morangos de acordo o limite de defeitos de cada categoria em porcentagem. ....	8
Tabela 3.2- Temperatura de transição vítrea de alguns alimentos. ....	14
Tabela 3.3- Propriedades térmicas do gelo e da água.....	18
Tabela 3.4- Propriedades químicas da trealose. ....	30
Tabela 3.5- Temperatura de transição vítrea de alguns açúcares. ....	33
Tabela 3.6- Calor de solução da trealose, maltose e sacarose. ....	35
Tabela 3.7- Comparação entre os processos de impregnação a vácuo, desidratação osmótica sob pressão atmosférica e salga.....	39
Tabela 3.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos.....	42
Tabela 4.1- Primeiro planejamento fatorial: identificação dos fatores significativos onde $t_1$ é o tempo de impregnação, $t_2$ é o tempo de relaxamento e $P$ é a pressão. ....	56
Tabela 4.2- Segundo planejamento fatorial: identificação da melhor condição de impregnação.....	57
Tabela 4.3- Esquema de ensaios de impregnação a vácuo com soluções de trealose. ...	59
Tabela 5.1 - Valores da massa específica das soluções de trealose a 22 °C, obtidas experimentalmente e calculadas teoricamente a 24°C (MICHAELIDIS, P. A., KROKIDA, M. K., RAHMAN, 2009). ....	67
Tabela 5.2- Viscosidade dinâmica das soluções de trealose a 22 °C. ....	67
Tabela 5.3- Índice de incorporação e teor de sólidos solúveis das amostras tratadas conforme primeiro planejamento fatorial. ....	68
Tabela 5.4- Valores de $p$ sobre o índice de incorporação e sobre o teor de sólidos solúveis, em que $t_1$ é o tempo de impregnação, $t_2$ é o tempo de relaxamento e $P$ é a pressão. ....	69
Tabela 5.5- Índice de incorporação e teor de sólidos solúveis das amostras submetidas aos tratamentos do segundo planejamento fatorial.....	74
Tabela 5.6- Teor de trealose em morangos <i>in natura</i> , em metades e inteiros impregnados com solução de 100 g/L de trealose.....	76
Tabela 5.7- Índice de incorporação, teor de umidade, sólidos solúveis e trealose nas amostras em metades impregnadas com soluções de trealose sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min. ....	78

Tabela 5.8- Volume e massa teóricos de solução de trealose incorporados nos diferentes tratamentos em função da concentração das soluções utilizadas .....	79
Tabela 5.9- Força máxima de pico da amostra <i>in natura</i> e após impregnação a vácuo sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min. ....	81
Tabela 5.10- Resultados da análise colorimétrica em relação aos parâmetros $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , <i>Hue</i> e <i>Croma</i> das amostras <i>in natura</i> e após impregnação a vácuo sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min. ....	82

## Lista de Símbolos

A	Área (m <sup>2</sup> )
C	Concentração da solução de trealose ( g trealose/ mL solução)
D	Diâmetro do espaço intercelular
h	Coefficiente de transferência de calor por convecção (W/m <sup>2</sup> K)
IC	Índice de impregnação (%)
k	Condutividade térmica (W/mK)
K	Constante da equação de Gordon-Taylor
L	Espessura (m)
m	Massa de solução incorporada (g solução / 100 g amostra)
m <sub>a</sub>	Massa da amostra (g)
m <sub>c</sub>	Massa da cápsula + areia (g)
m <sub>d</sub>	Massa da amostra descongelada (g)
m <sub>f</sub>	Massa da amostra após impregnação (g)
m <sub>in</sub>	Massa da amostra <i>in natura</i> (g)
m <sub>pic</sub>	Massa do picnômetro (g)
m <sub>picm</sub>	Massa do picnômetro com amostra (g)
m <sub>picw</sub>	Massa do picnômetro com água (g)
m <sub>s</sub>	Massa do sistema (cápsula + areia + amostra) após secagem (g)
n	Número de componentes
P	Pressão (mmHg)
T	Temperatura (°C)
t	Tempo (s)
t <sub>1</sub>	Tempo de impregnação (min)
t <sub>2</sub>	Tempo de relaxamento (min)
T <sub>a</sub>	Temperatura ambiente (°C)
T <sub>c</sub>	Temperatura de congelamento (°C)
t <sub>c</sub>	Tempo de congelamento (s)
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea (°C)
T <sub>g,s</sub>	Temperatura de transição vítrea dos sólidos (°C)
T <sub>g,w</sub>	Temperatura de transição vítrea da água (°C)
T <sub>i</sub>	Temperatura inicial (°C)

$T_M$	Temperatura do meio de congelamento ( $^{\circ}\text{C}$ )
$T_s$	Temperatura da superfície ( $^{\circ}\text{C}$ )
$T_t$	Teor de trealose (g trealose / 100 g amostra)
$t_w$	Tempo de escoamento da água no viscosímetro de Ostwalt (s)
$V_{pic}$	Volume real do picnômetro (mL)
$v_s$	Volume da solução (mL solução / 100 g amostra)
$x_1, x_2$ e $x_3$	Variáveis independentes
$X_i$	Fração mássica do componente i
$X_s$	Fração mássica de sólidos
$x_v$	Volume ocupado pelo líquido
$X_w$	Fração mássica da água
$z$	Comprimento do espaço intercelular

### Símbolos Gregos

$\mu$	Viscosidade absoluta (mPa.s)
$\Delta H_{sol}$	Calor de solução (kJ/mol)
$\Delta m_d$	Varição de massa após descongelamento (%)
$\Delta P$	Varição de Pressão (mmHg)
$\eta$	Viscosidade cinemática ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$\eta_w$	Viscosidade cinemática da água ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
$\lambda$	Calor latente de fusão (kJ/kg)
$\rho$	Massa específica ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )
$\rho_w$	Massa específica da água ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

## Capítulo 1- Introdução

Devido às mudanças no estilo de vida, a busca por alimentos mais práticos e mais duradouros é cada vez maior; sendo que, essa facilidade é oferecida pelos alimentos congelados, os quais podem ser conservados por longos períodos, com manutenção de qualidade sensorial e nutricional. Além disso, o congelamento de alimentos permite a disponibilidade de alimentos sazonais e regionais durante todo o ano e em todas as partes do mundo.

No congelamento, a conservação se dá pela redução da temperatura de tal forma que as taxas das reações que causam deterioração ficam praticamente negligenciáveis. Estas reações causam mudanças de natureza microbiológica, como o do crescimento de micro-organismos; fisiológica, como a maturação e respiração; bioquímica, como reações de escurecimento, oxidação lipídica e degradação de pigmentos; e física, como a perda de umidade. A vida de prateleira de produtos congelados depende da temperatura de armazenamento dos mesmos sendo que, quanto menor a temperatura de armazenamento, maior a vida de prateleira do produto (HELDMAN; HARTEL, 1998; JAMES; JAMES, 2014).

O morango é chamado de “pequeno fruto”, muito apreciado mundialmente devido ao seu sabor peculiar e versatilidade em relação ao seu consumo. As formas de consumo são variadas: *in natura* e/ou na preparação de geleias, iogurtes, tortas, bolos, bolachas, sucos e doces em geral. A fruta é muito utilizada tanto industrialmente como domesticamente e a maior parte das suas variedades tem comportamento sazonal, o que se constitui em um problema para o mercado. O congelamento do morango é de grande interesse, pois garante a produção anual de manufaturados que o contém como matéria-prima. Como fator limitante, o fruto apresenta estrutura frágil, muito sensível ao congelamento, resultando em alterações sensoriais. Este fator limitante torna-se um desafio a ser pesquisado.

A qualidade dos produtos congelados e descongelados pode ser melhorada com a modificação da composição dos tecidos. Diferentes compostos, chamados crioprotetores, têm apresentado efeito protetor às células. Entre eles, pode-se citar a glicose, a frutose, a lactose, a manose, o sorbitol, a sacarose, a trealose, a pectina, o cloreto de cálcio, as proteínas anticongelamento, entre outros (BETORET et al., 2015;

RADZIEJEWSKA-KUBZDELA; BIEGANSKA-MARECIK; KIDON, 2014). Ao modificar a composição dos tecidos com crioprotetores, a forma de crescimento dos cristais de gelo é modificada e tem-se um aumento da resistência dos tecidos pela interação do crioprotetor com os compostos da parede celular. Entretanto, o modo de atuação de muitos crioprotetores ainda é uma incógnita (ATICI; NALBANTOĞLU, 2003; CRUVINEL. et al., 2009).

Muitos açúcares vêm sendo estudados por terem demonstrado efeito crioprotetor. A trealose, que é um dissacarídeo, é encontrada em alguns fungos, plantas e invertebrados e vem se destacando pelo seu efeito crioprotetor em produtos congelados e desidratados. Porém a sua efetividade em diferentes matrizes precisa ser verificada bem como a otimização do modo de incorporá-la e de seu efeito crioprotetor.

A incorporação de crioprotetores pode ser realizada através da impregnação a vácuo que é um dos métodos mais rápidos para introduzir uma fase líquida em uma matriz sólida. O método consiste em remover o gás presente nos espaços intercelulares e introduzir um líquido externo devido à ação de mecanismos hidrodinâmicos. A força motriz para a transferência de massa é a diferença de pressão e não a diferença de concentração, como ocorre na desidratação osmótica. Porém, alguns estudos mostram que as condições do processo variam de acordo com a matriz e influenciam na efetividade do método.

Muitos estudos na área da medicina e biologia envolvendo crioprotetores já foram realizados. Porém a utilização de crioprotetores em alimentos é muito recente e pouco se tem sobre a utilização de crioprotetores introduzidos em matrizes alimentares por impregnação a vácuo.

O presente trabalho está estruturado na forma descrita a seguir. No capítulo 2 são apresentados os objetivos do trabalho. No capítulo 3 é apresentada uma revisão sobre o morango, suas características botânicas e físico-químicas e aspectos econômicos; também é apresentada uma revisão sobre alimentos congelados, os aspectos econômicos envolvidos e como ocorre o processo de congelamento em alimentos. O descongelamento e as alterações causadas pelo congelamento nos alimentos também são revisados no mesmo capítulo. E ainda, é feita uma breve revisão sobre os agentes crioprotetores, em especial a trealose e alguns estudos que a utilizam. O capítulo encerra com uma revisão sobre impregnação a vácuo e é apresentada uma relação de estudos recentes que utilizam o método em alimentos com diferentes finalidades.



---

O capítulo 4 apresenta a metodologia utilizada para desenvolver o trabalho bem como os materiais e os métodos utilizados para a realização da impregnação a vácuo e as análises realizadas. Os resultados e a discussão dos mesmos são apresentados no capítulo 5. As conclusões e sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no capítulo 6.

## Capítulo 2- Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi verificar o efeito crioprotetor da trealose em morangos, utilizando como método de incorporação a impregnação a vácuo. Busca-se, desta forma, verificar e comparar alterações relacionadas à qualidade dos frutos com e sem a presença da trealose para obter informações sobre a atuação do açúcar nos frutos e contribuir para a obtenção de morangos congelados com características próximas aos frutos *in natura*.

Dentro desse contexto, os objetivos específicos foram:

- identificar a influência dos parâmetros do processo de impregnação a vácuo (pressão aplicada, tempo de impregnação e tempo de relaxamento) no índice de incorporação em morangos e identificar qual a melhor condição de pressão, tempo de impregnação e tempo de relaxamento para a impregnação a vácuo em morangos;
- identificar a melhor condição da amostra durante o processo para obter maior impregnação da trealose nos morangos;
- verificar através de cromatografia líquida de alta eficiência a quantidade de trealose incorporada através da impregnação a vácuo em uma dada condição experimental e a quantidade aderida à matriz após o descongelamento;
- verificar as alterações de cor, textura, sólidos solúveis e umidade em morangos ocasionadas pela impregnação a vácuo;
- verificar o poder crioprotetor da trealose em relação às alterações de cor, textura, sólidos solúveis, umidade e perda de massa (perda por gotejamento) de morangos congelados e descongelados.

## Capítulo 3- Revisão Bibliográfica e Fundamentos Teóricos

Neste capítulo são apresentadas algumas características botânicas e físico-químicas do morango, bem como os aspectos econômicos que envolvem a fruta; é apresentada, também, uma revisão sobre produtos congelados em relação aos aspectos econômicos destes produtos, como ocorre o congelamento e o descongelamento e as alterações que tais processos podem provocar nos alimentos. São apresentadas as características gerais dos crioprotetores utilizados na preservação de produtos congelados, em específico a trealose, e um dos métodos de introdução, o método de impregnação a vácuo, é detalhado.

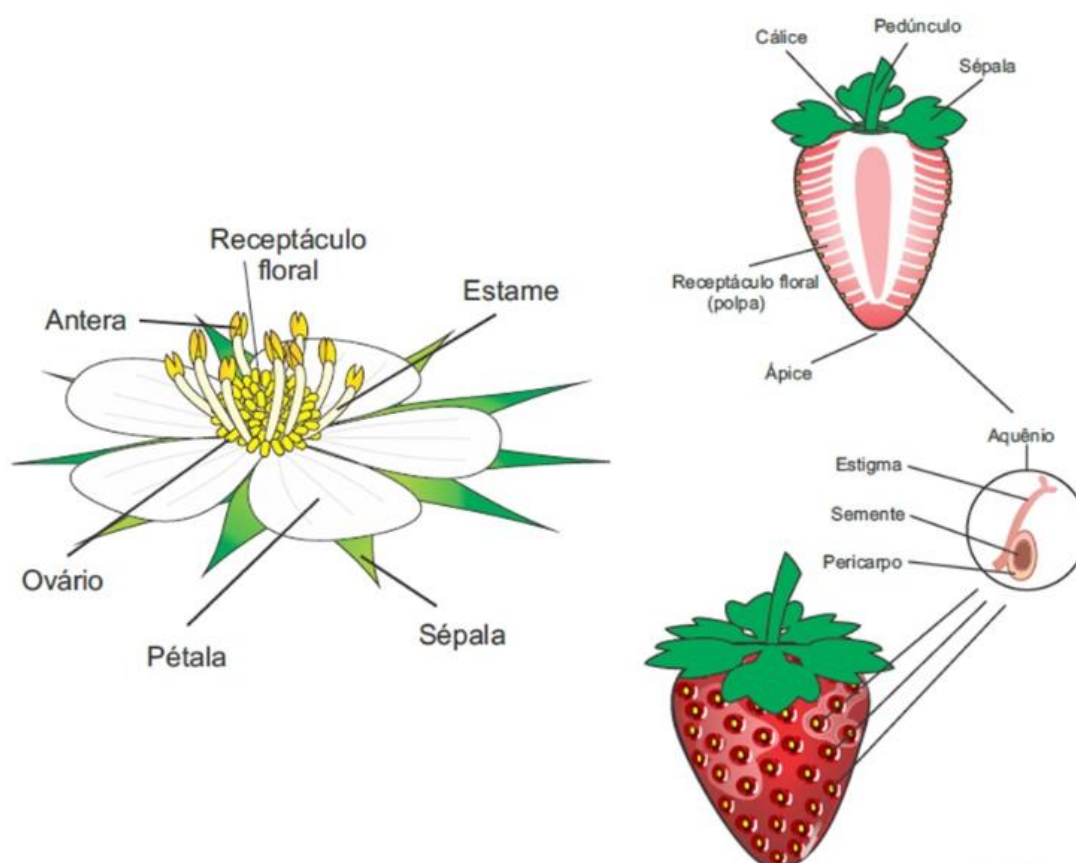
### 3.1 O Morango

#### 3.1.1 Características Botânicas e Físico- químicas do Morango

O morangueiro é uma planta herbácea, rasteira e perene que pertence à família das rosáceas, cuja reprodução é assexuada e ocorre a partir dos estolões que a planta emite, formando mudas (RONQUE, 1998). A parte comestível é um receptáculo carnoso e suculento, de coloração vermelha, formando um pseudofruto, chamado morango. A produção do morango inicia-se 60 dias após o plantio e os frutos verdadeiros são os arquênios, estruturas diminutas que contêm as sementes aderidas ao receptáculo (REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, 2016). A Figura 3.1 apresenta a morfologia do morango e da planta, o chamado morangueiro.

O morango, *Fragaria x ananassa Duch*, é um híbrido resultante do cruzamento das espécies americanas *F. chiloensis*, *F. virginiana* e *F. ovalis*, e da europeia *F. vesca* (PASSOS, 1997). Tecnicamente, trata-se o morango como um pequeno fruto (TOBERGTE; CURTIS, 2013).

Figura 3.1- Morfologia do morango e do morangueiro.



Fonte: PBMH & PIMo- Programa Brasileiro para a Modernização da Horticultura & Produção Integrada de Morango (2009).

Para o cultivo, de acordo com Gonçalves et al. (2015), as variedades de morangueiro são divididas em grupos, conforme a resposta ao fotoperíodo. Os grupos são apresentados a seguir.

a) Morangos de dias curtos: são as variedades cuja a iniciação floral só ocorre quando o fotoperíodo é inferior a 14 horas e a temperatura inferior a 15 °C. Os principais cultivares são: Camarosa, Camino Real, Oso Grande, Strawberry Festival, Ventana e Benicia.

b) Morangos de dias neutros: são as variedades que florescem continuamente, independente do fotoperíodo.

c) Morango de dias longos: são as variedades que florescem quando o fotoperíodo é maior que 12 horas. Estas variedades não são comercializadas no Brasil.

Em relação à respiração, os morangos comportam-se de modo não-climatérico (PRASANNA; PRABHA; THARANATHAN, 2007). Os frutos não-climatéricos apresentam taxa respiratória baixa e constante após a colheita. Para que estes frutos

atingam estágio ideal de doçura e acidez, devem permanecer na planta até o final do processo de maturação.

Devido ao comportamento não-climatérico, os morangos são colhidos próximos a sua maturação fisiológica. De acordo com Cantillano (2011), o parâmetro mais importante para definir o correto ponto de colheita do morango é a cor. Para ser colhido, o fruto deve ter no mínimo 60 a 75% da sua superfície de cor vermelha brilhante, quando destinado ao consumo da fruta fresca. Quando a fruta é destinada à industrialização, deve estar mais madura, com praticamente 100% da sua superfície de cor vermelha. O estágio de maturação na hora da colheita influencia na sua vida de prateleira. Quando maduros, os morangos possuem alta umidade, mais de 90%, fato que contribui para a alta perecibilidade que apresentam (MISRAN, 2013). Gonçalves et al. (2012) e Reisser Jr. et al. (2014) recomendam que os morangos sejam resfriados até 2 h após a colheita e mantidos a 0 °C para diminuir a deterioração dos mesmos. A perda de qualidade dos morangos inicia na senescência, quando a membrana das células começa a perder sua integridade devido à ação de enzimas naturalmente presentes nos morangos (PALIYATH; SUBRAMANIAN, 2008). Devido à alta perecibilidade, estudos são feitos a fim de prolongar a vida de prateleira após colheita; entre eles, a aplicação de embalagens com nanopartículas de prata (PUTI et al., 2014), o uso de atmosfera modificada (CANTILLANO; SCHUNEMANN, 2015), irradiação (FRANÇOSO et al., 2008), fumigação de cepas de micro-organismos (QIN et al., 2016) e aplicação de alta pressão hidrostática (GAO et al., 2016). Na década de 1990, começaram a ser produzidas as primeiras plantas geneticamente modificadas na busca por resistência a vírus, insetos, herbicidas, estresse biótico e abiótico (ANTUNES; HOFFMANN, 2012).

De acordo com o PBMH & PIMo - PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE MORANGO (2009), no Brasil, os morangos são divididos em classes que têm como critério o maior diâmetro equatorial. A classe 15 engloba os morangos com diâmetro entre 15 e 35 mm e a classe 35 engloba aqueles com diâmetro maior que 35 mm. Além disso, o diâmetro do maior fruto não pode ser 50% superior ao diâmetro do menor fruto na mesma embalagem. Já a classificação por categoria dos morangos impõe os limites de defeitos permitidos conforme é exposto na Tabela 3.1. Na categoria extra, por exemplo, não pode haver morangos com defeitos graves. Além disso, não mais que 5% dos morangos podem apresentar defeitos leves. Por sua vez, todos os morangos da

categoria II podem apresentar algum tipo de defeito leve e até 10% pode apresentar algum tipo de defeito grave.

Tabela 3.1 – Classificação dos morangos de acordo o limite de defeitos de cada categoria em porcentagem.

Defeito	Categoria		
	Extra	I	II
Podridão	0	1	5
Outros defeitos graves	0	3	5
Total de defeitos graves	0	3	10
Total de defeitos leves	5	10	100
Total de defeitos	5	10	100

Fonte: PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE MORANGO (2009).

Os defeitos graves inviabilizam o consumo: danos mecânicos, imaturidade, podridão, deformação e lesão profunda. Os defeitos leves não impedem o consumo e são danos superficiais como coloração não característica, deformações leves, interior oco e presença de materiais estranhos.

A doçura do morango não tem relação direta com a coloração. Frutos mais doces são característicos de determinados cultivares que sofrem influência das condições ambientais. Períodos nublados, com excesso de chuva, tornam o morango menos doce (ANTUNES; HOFFMANN, 2012).

Em 100 g de morangos, pode-se encontrar: 92,8 g de água, 2,3 g de fibras e 39 calorias. Além disso, estão presentes as vitaminas B1, B2, B5 e C, além de potássio, cálcio, ferro e fósforo. Os morangos também são ricos em compostos fenólicos (GIAMPIERI et al., 2012). Yang et al. (2016) encontraram vinte e dois compostos fenólicos no morango e verificaram o poder antioxidante dos mesmos. Giampieri et al. (2016) verificaram em ratos que o consumo de morango tem ação antioxidante sobre as células. Fumagalli et al. (2016) apresentaram o poder anti-inflamatório dos taninos presentes no morango. Estudos apresentados por Teleszko, Nowicka e Wojdylo (2016), Tudor et al. (2015), Wicklund et al. (2005) e Hornedo- Ortega et al. (2016) também mostram que o morango tem grande potencial antioxidante, podendo trazer vários benefícios à saúde.

### 3.1.2 Aspectos Econômicos

O morango tem grande aceitação pelo seu sabor atrativo, aroma e formato, sendo muito utilizado para consumo *in natura*, para o processamento (geleias e polpas) e para uso em sobremesas e confeitaria. Seu cultivo iniciou no século XIX (TEIXEIRA, 2011) e nos últimos cinco anos os principais produtores são a China, Estados Unidos, Turquia, Espanha, México e Coreia do Sul (FAOSTAT, 2012).

De acordo com Antunes et al. (2015), a produção mundial do morango aumentou 16% de 2006 a 2012, enquanto que a área plantada apresentou redução de 9%. O consumo é motivado pelo seu sabor peculiar, aparência atraente e pelos benefícios que traz à saúde, pois possui elevados níveis de antioxidantes, vitamina C e conteúdo de fibras (REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, 2016). A União Europeia produziu, de 2011 a 2013, em média, 1070 toneladas de morangos por ano sendo a Espanha, a Polônia e a Alemanha os responsáveis por maior parte da produção (EUROPEAN UNION COMMISSION, 2014).

No Brasil, não há dados recentes sobre a produção de morangos. No entanto, sabe-se que no ano de 2012 a produção aproximada do fruto foi de 45 mil toneladas, sendo Minas Gerais o estado responsável pela maior parte da produção (55%), seguido por São Paulo (30%) e o Rio Grande do Sul (15%) (ANTUNES; PERES, 2013). Em 2013, de acordo com Reisser Jr. et al. (2014), a área plantada para o cultivo de morangos no Brasil era de 4.000 hectares, com a produtividade média de 30 toneladas/hectare a 60 toneladas/hectare dependendo do cultivar e das condições climáticas. Também de acordo com Reisser Jr. et al. (2014), a produção em 2014 aumentou para 133 mil toneladas, o que representa um volume baixo perto dos Estados Unidos (1.313 mil ton/ano), da Turquia (302 mil ton/ano) e da Espanha (263 mil ton/ano).

O morango é uma fruta sazonal, tendo maior oferta no Brasil nos meses de setembro a março. Há produção o ano inteiro com a colheita de morangos de cultivares de dias neutros, porém o valor de venda, devido à baixa oferta, aumenta em até quatro vezes. A exportação de morangos brasileiros *in natura* é dez vezes maior em volume que a exportação de morangos congelados. Em relação à importação, o comportamento é contrário. O Brasil importa 160 vezes mais morangos congelados do que morangos *in natura* (ANTUNES et al., 2015). De acordo com a IBRAF - Instituto Brasileiro de

Frutas (2011), o volume de exportação do morango fresco aumentou 19% de 2009 para 2010 enquanto o volume de morango congelado diminuiu também 19% neste mesmo período.

## 3.2 Alimentos Congelados

### 3.2.1 Aspectos Econômicos

A utilização da conservação de alimentos pela indústria alimentícia através do congelamento tem seus primeiros registros em 1842 quando H. Benjamin recebeu uma patente por ter congelado alimentos mediante imersão em gelo e salmoura. Vinte e três anos mais tarde, tem-se o registro do início da utilização do congelamento de peixe em escala comercial nos Estados Unidos. A técnica de conservação através do congelamento passou a ser cada vez mais utilizada e aprimorada. Porém, somente em 1916, o congelamento rápido de alimentos foi conseguido por R. Plank, E. Ehrenbaum e K. Reuter (JAY, 2005). De acordo com Barbosa-Cánova, Altunakar e Maija-Lorio (2005), outra vantagem do congelamento é o custo, que gira em torno de 10% do produto final; comparado a outros métodos de conservação, o congelamento tem o melhor custo- benefício.

O congelamento permite disponibilizar alimentos de forma prática tanto a nível doméstico como industrial. Um exemplo são as comidas prontas, que possuem uma grande variedade ofertada no mercado, muitas delas oferecidas na própria embalagem de consumo; e representam uma revolução na indústria de alimentos (POTTER; HOTCHKISS, 1999).

O mercado de vegetais congelados começou a ganhar importância em 1929, mas foi somente em 1940 que as técnicas foram aprimoradas e o mercado cresceu significativamente (BARBOSA-CÁNOVA; ALTUNAKAR; MEIJA-LORIO, 2005). Ainda assim, existem muitas limitações ao se congelar alimentos devido aos aspectos relacionados à qualidade dos produtos e, mesmo com os avanços industriais, têm-se limitações em relação aos gastos energéticos. As limitações relacionadas à qualidade estão fortemente ligadas à formação dos cristais de gelo que causam danos irreversíveis na estrutura da maioria dos alimentos (HELDMAN; HARTEL, 1998). Alguns aspectos



como a preservação da cor, textura e sabor dos alimentos congelados necessitam de melhorias, especialmente em tecidos vegetais, os quais são extremamente difíceis de proteger das injúrias causadas pelo frio (DYMEK et al., 2015; VELICKOVA et al., 2013; XIE; ZHAO, 2004). De acordo com Gruda e Postolski (1986), as frutas são as que mais sofrem danos durante o congelamento devido à fragilidade dos seus tecidos. São as frutas, também, que possuem o mercado mais afetado pela sazonalidade fazendo com que a necessidade de conservação por longos períodos seja sanada.

Cada vez mais, buscam-se alimentos conservados por mais tempo, de forma prática e saudável. O congelamento, por ser uma técnica de conservação, traz várias vantagens, tais como a disponibilidade de alimentos sazonais durante todo o ano, em todos os locais do mundo e com forma de consumo variada. Segundo o SINCONGEL-Sindicato da Indústria Alimentar de Congelados, Supercongelados, Sorvetes, Concentrados e Liofilizados do Estado de São Paulo (2015), a indústria de congelados, que compreende as categorias de pratos prontos, vegetais, pães e massas congelados alcançou, em 2014, um faturamento de R\$ 10,98 bilhões, o que significa um aumento de 21,7% em relação ao faturamento do ano anterior. Ao longo dos últimos quatro anos, o setor cresceu à taxa média de 21,4% ao ano. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação - ABIA (2015), o segmento de supercongelados e congelados faturou R\$ 14,5 bilhões em 2015, aumento de 9,85% em relação ao ano anterior.

Comercialmente, os principais alimentos congelados são:

- frutas inteiras, purês e sucos concentrados de morango, laranja e framboesa;
- vegetais, como ervilhas, vagem, milho, espinafre, brotos e batatas;
- filés de peixe e frutos do mar crus ou em forma de pratos prontos acompanhados com molho, como bacalhau, linguado, camarões, caranguejo e iscas de peixe;
- carnes e produtos cárneos, como gado, cordeiro e aves;
- produtos assados, como pão, bolos e tortas;
- alimentos preparados, como pizzas, sobremesas, sorvete e refeições completas.

De acordo com Instituto Internacional del Frío (1990), a maior parte das frutas industrialmente congeladas destina-se ao processamento de conservas, polpas, sucos, bebidas e iogurtes.

### 3.2.2 Congelamento de Alimentos

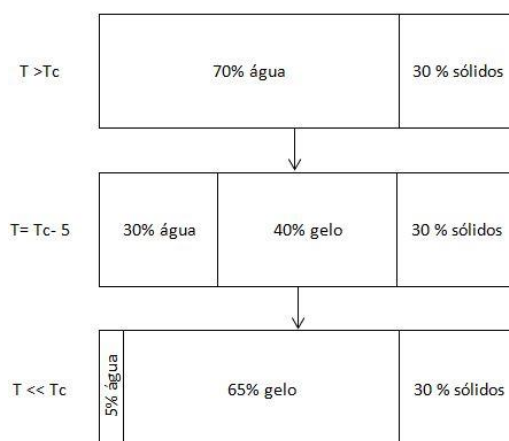
O processo de congelamento dá-se devido à troca térmica entre um produto e o meio que o envolve, o qual possui uma temperatura mais baixa. Se a temperatura atingida com o processo de resfriamento não for inferior à temperatura de formação de cristais de gelo, diz-se que produto está resfriado. Quando ocorre a formação de cristais de gelo devido à redução da temperatura abaixo do ponto de congelamento da porção de água do alimento, diz-se que o produto está congelado (FELLOWS, 2007; JAMES; JAMES, 2014). O Instituto Internacional del Frío (1990) define produtos congelados como aqueles que possuem pelo menos 80% da sua água livre transformada em cristal de gelo com a finalidade de reduzir as modificações físicas, químicas e microbiológicas do produto.

Para Brennan et al. (1990), a maior temperatura em que um cristal de gelo existe de forma estável é considerado o ponto de início de congelamento. Como alimentos são sistemas heterogêneos, o Instituto Internacional del Frío (1990) considera que a temperatura de congelamento é marcada por um ponto em que se iniciam os primeiros cristais em um intervalo de temperatura no qual o gelo se forma. Fellows (2007) define o ponto de congelamento de um alimento como “a temperatura na qual um cristal de gelo minúsculo existe em equilíbrio com a água ao seu redor”.

A temperatura de início de congelamento, de acordo com o Instituto Internacional del Frío (1990), depende da concentração de solutos diluídos no produto; quanto mais concentrado é o produto, mais baixo é o seu ponto de congelamento. Heldman e Hartel (1998) completam que produtos que contêm solutos de baixa massa molar apresentam maior diminuição do ponto inicial de congelamento. Todos os alimentos iniciam a formação dos cristais de gelo a uma temperatura mais baixa que da água pura. À medida que a água vai congelando, a concentração de sólidos na água não congelada vai aumentando, fazendo com que a temperatura de congelamento diminua. De acordo com Brennan et al. (1990), o ponto final de congelamento não é definido visto que, mesmo à temperaturas abaixo do ponto de congelamento, ainda há presença de água líquida. A Figura 3.2 esquematiza as mudanças que tipicamente ocorrem durante o congelamento de um alimento. Conforme indicado, percebe-se que as mudanças estruturais ocorrem em função da temperatura: um alimento que possui cerca de 70% de água à temperatura ambiente (T), quando submetido a uma temperatura 5 °C

abaixo do ponto inicial de congelamento ( $T_c$ ), apresenta 40% da água em estado congelado. Quando este mesmo alimento é submetido a uma temperatura muito mais baixa do que a temperatura de congelamento, a concentração de sólidos solúveis é muito mais alta do que no estado inicial, ou seja, os 30% de sólidos que estavam inicialmente dissolvidos em 70% de água ficam dissolvidos em aproximadamente 5% de água.

Figura 3.2- Mudanças na composição de um alimento durante congelamento onde  $T$  é a temperatura e  $T_c$  é a temperatura de congelamento.



Fonte: Adaptado de Heldman e Hartel (1998).

À medida que a água extracelular se torna gelo, ocorre migração da água intracelular devido à pressão osmótica. O conteúdo intracelular, por sua vez, torna-se mais concentrado e, como consequência, seu ponto de congelamento diminui. Em sistemas celulares, pode-se dizer que o congelamento rápido produz o congelamento da porção interna da célula por não ocorrer essa diferença de concentração devido à rapidez do processo, enquanto que o congelamento lento produz a desidratação intracelular e a formação de gelo somente na região extracelular (HUNG; ERICKSON, 1997). Em soluções ideais, a cristalização ocorre no ponto eutético; nos alimentos, a temperatura do ponto eutético é muito mais baixa do que usualmente se utiliza, em torno de  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Assim, mesmo alimentos congelados a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  apresentam água não congelada (HELDMAN; HARTEL, 1998).

A temperatura eutética é aquela na qual um cristal de um determinado soluto existe em equilíbrio com a solução não congelada e o gelo. Em alimentos congelados comerciais (aproximadamente armazenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), água não congelada sempre está presente visto que a temperatura eutética final, geralmente, é mais baixa. A quantidade de água não congelada, que depende do tipo de alimento e da temperatura de estocagem,

forma, abaixo da temperatura eutética, um estado vítreo que engloba os cristais de gelo. Este estado vítreo protege a textura do alimento e proporciona uma boa estabilidade ao armazenamento. Muitos produtos, como as frutas, por exemplo, não são armazenados a temperaturas abaixo da sua temperatura de transição vítrea, visto que esta é muito baixa, e, em função disso, sofrem perdas em sua textura, além das perdas causadas pelos cristais de gelo (FELLOWS, 2007).

A Tabela 3.2 mostra a temperatura de transição vítrea de alguns alimentos. Considerando que os produtos são estocados comercialmente, em sua maioria, em temperaturas por volta de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , percebe-se que a maioria deles é estocado acima da temperatura de transição vítrea.

Tabela 3.2- Temperatura de transição vítrea de alguns alimentos.

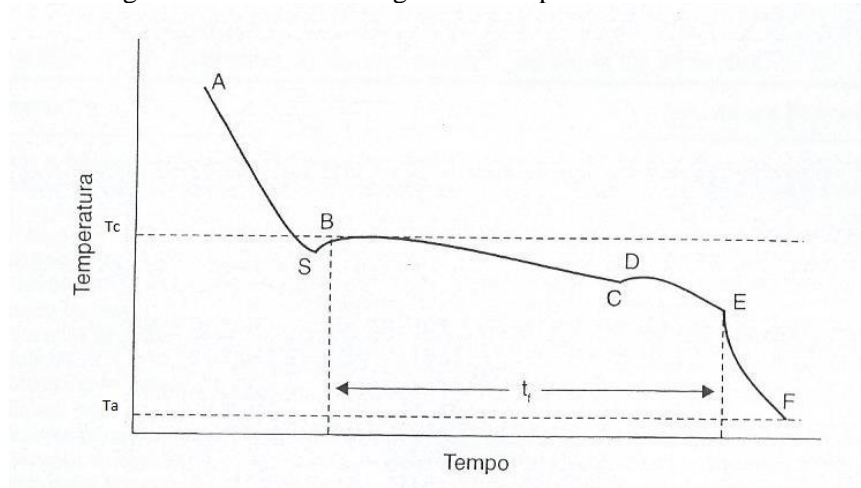
<b>Alimento</b>		<b>Temperatura de transição vítrea (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
<i>Frutas e derivados</i>	Maçã	-41 a -42
	Banana	-35
	Pêssego	-36
	Morango	-33 a -41
	Tomate	-41
	Suco de uva	-42
	Suco de abacaxi	-37
<i>Hortaliças</i>	Milho verde fresco	-15
	Batata fresca	-12
	Ervilha congelada	-25
	Brócolis congelado	-12
	Espinafre congelado	-17
<i>Sobremesas</i>	Sorvete	-31 a -33
<i>Queijos</i>	Cheddar	-24
	Queijo cremoso	-33
<i>Pescados e carnes</i>	Bacalhau	$-11,7 \pm 0,6$
	Músculo de cavala	$-12,4 \pm 0,2$
	Músculo bovino	$-12 \pm 0,3$

Fonte: FELLOWS (2007).

Para que ocorra o congelamento, deve ser removido primeiramente o calor sensível para que a temperatura diminua até o ponto de congelamento. Deve-se remover

também o calor produzido pela respiração que ocorre em alguns alimentos frescos. Após esta etapa, deve-se remover o calor latente para que se formem os cristais de gelo. A Figura 3.3 mostra um exemplo de uma curva de congelamento, representada pelo trajeto A-F, cujas etapas estão descritas a seguir.

Figura 3.3- Curva de congelamento típica de um alimento.



Fonte: FELLOWS (2007).

Trajeto AS: nesta etapa, o calor sensível é removido e a temperatura do alimento baixa até o ponto S, que está a uma temperatura menor que o ponto de congelamento,  $T_c$ . A temperatura  $T_c$ , com exceção da água pura, é sempre abaixo de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No ponto S, ocorre o fenômeno chamado de super-resfriamento, quando a água permanece líquida mesmo estando abaixo do seu ponto de congelamento.

Trajeto SB: os cristais de gelo começam a se formar à medida que o calor latente de cristalização é liberado e a temperatura sobe até seu ponto de congelamento.

Trajeto BC: durante esta fase é formada a maior parte do gelo. À medida que os cristais de gelo aumentam, aumenta a concentração de soluto na parte não-congelada, portanto, o ponto de congelamento diminui.

Trajeto CD: um dos solutos torna-se supersaturado, cristaliza e, pela liberação do calor latente de cristalização, a temperatura eleva-se até a temperatura eutética daquele soluto.

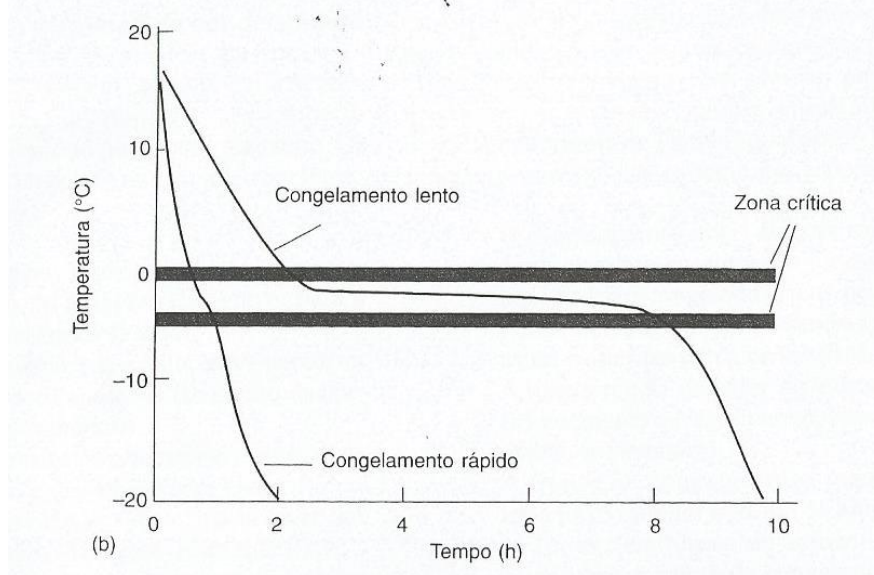
Trajeto DE: Continua a cristalização da água e dos solutos.

Trajeto EF: A temperatura cai até a temperatura de armazenamento ( $T_a$ ).

Outro fenômeno que ocorre em processos de congelamento, antes da formação dos cristais de gelo, é a nucleação, que pode ser homogênea ou heterogênea. Na nucleação homogênea, a orientação e a combinação de moléculas de água são casuais. Na nucleação heterogênea, mais provável em alimentos, ocorre a formação de um núcleo ao redor de partículas suspensas ou em uma parede celular. As moléculas de água têm preferência por migrar para um núcleo já existente ao invés de formar novos núcleos. Altas taxas de transferência de calor produzem um grande número de núcleos e, por isso, o congelamento rápido forma um grande número de pequenos cristais. O tamanho dos cristais não depende somente da forma de congelamento, mas também da composição química dos alimentos (FELLOWS, 2007).

Durante o congelamento lento, o alimento permanece mais tempo na zona crítica, zona que determina o tamanho e número de cristais. A diferença do tempo em que o alimento permanece na zona crítica durante o congelamento lento e o congelamento rápido está mostrado na Figura 3.4. Por permanecer mais tempo na zona crítica, o alimento que é congelado de forma lenta tende a ter menor número de cristais de gelo, visto que ocorre a migração da água aos núcleos já formados, formando cristais maiores.

Figura 3.4- Curvas de congelamento de um alimento em processo lento e rápido.

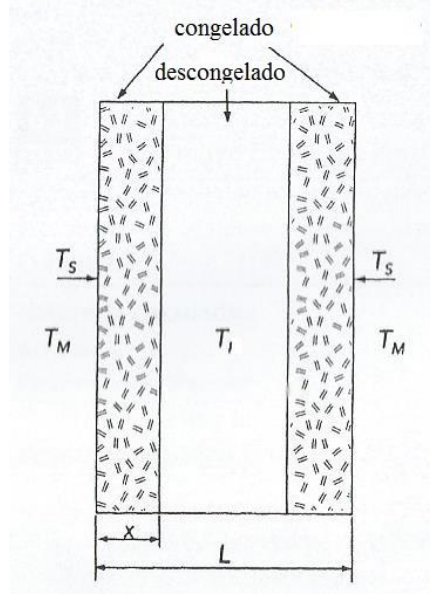


Fonte: FELLOWS (2007).

A Figura 3.5 esquematiza o congelamento de um alimento, onde,  $T_M$  é a temperatura do meio de congelamento,  $T_s$  é a temperatura da superfície e a temperatura  $T_i$  no centro do produto é a temperatura inicial. O congelamento inicia nas extremidades

submetidas à temperatura mais baixa ( $T_s$ ). À medida que o processo de congelamento avança, as camadas congeladas nas extremidades aumentam até o momento em que elas se encontram e o centro do produto congela. As propriedades do produto, assim como a diferença de temperatura entre  $T_s$  e  $T_M$  são fatores que influenciam no tempo de congelamento.

Figura 3.5- Processo de congelamento em um alimento.



Fonte: Adaptado de HELDMAN; HARTEL (1998).

Os fatores que exercem maior influência no tempo de congelamento de acordo com Heldman e Hartel (1998) são:

- a condutividade térmica do produto ( $k$ );
- o coeficiente de transferência de calor por convecção ( $h$ ) na superfície exposta ao meio;
- a área de transferência de calor, influenciada pelo formato do produto ( $A$ );
- a temperatura do meio de congelamento ( $T_M$ );
- o tamanho do produto, definido pela espessura ( $L$ );
- a massa específica do produto ( $\rho$ );
- o calor latente de fusão ( $\lambda$ ).

### 3.2.3 Descongelamento de Alimentos

Considera-se descongelado um alimento quando o seu centro geométrico atinge 0 °C. Porém, dependendo do produto e da sua aplicação, diferentes temperaturas podem ser atingidas em processos de descongelamento. Durante o descongelamento, deve-se evitar o aquecimento em excesso, minimizar os tempos de descongelamento e evitar a desidratação excessiva para que os danos causados durante o congelamento ou recristalização sejam minimizados (INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO, 1990).

O descongelamento não é o processo reverso do congelamento. Devido à diferença de calor específico, condutividade térmica e difusividade térmica da água e do gelo, o perfil de temperatura de um alimento descongelando não é o inverso de um alimento congelando (HUNG; ERICKSON, 1997). O descongelamento é um processo mais lento em função da presença de uma camada de água superficial com propriedades térmicas menores do que o gelo, formando uma camada termicamente isolante no produto. A condutividade térmica da água é aproximadamente um quarto do valor da condutividade térmica do gelo, enquanto que a difusividade térmica da água é um nono da difusividade térmica do gelo, conforme mostrado na Tabela 3.3. À medida que a porção descongelada aumenta, esse efeito também aumenta (BRENNAN et al., 1990; FELLOWS, 2007).

Tabela 3.3- Propriedades térmicas do gelo e da água.

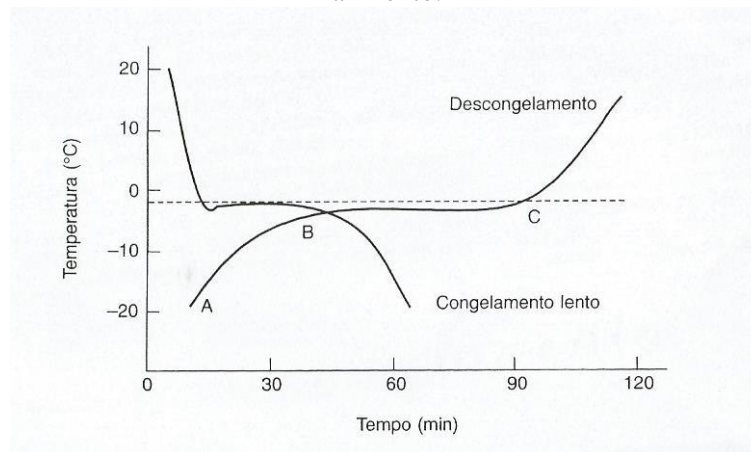
Propriedade	Temperatura (°C)			
	Gelo		Água	
	-20	0	0	+20
Massa específica (kg/m <sup>3</sup> )	919,3	916,8	999,84	998,21
Pressão de vapor (kPa)	0,103	0,6113	0,6113	2,3388
Capacidade calorífica (J/g/K)	1,9544	2,1009	4,2176	4,1818
Condutividade térmica (W/m/K)	2,433	2,240	0,561	0,5984
Difusividade térmica (m <sup>2</sup> /s)	11,8 x 10 <sup>-7</sup>	11,7 x 10 <sup>-7</sup>	1,3 x 10 <sup>-7</sup>	1,4 x 10 <sup>-7</sup>
Compressibilidade (Pa <sup>-1</sup> )		2	4,9	

Fonte: LIDE (2003).



No início do processo de descongelamento, a temperatura eleva-se rapidamente devido à ausência de água na superfície. Após este período, o produto fica um longo tempo na temperatura próxima ao do gelo fundente; é nesta fase que a água celular é perdida junto com nutrientes solúveis nela. Além de causar danos sensoriais ao produto, a água expelida é substrato para o crescimento microbiano por conter nutrientes (FELLOWS, 2007). A Figura 3.6 esquematiza o processo de descongelamento de um alimento. Percebe-se que, mesmo comparado ao processo de congelamento lento, nas mesmas condições, o processo de descongelamento é ainda mais lento. Na Figura 3.6, as etapas do processo de descongelamento descritas são representadas pelos trechos AB e BC.

Figura 3.6- Comparação entre o processo de descongelamento e congelamento lento de um alimento.



Fonte: FELLOWS (2007).

### 3.2.4 Alterações Causadas pelo Congelamento nos Alimentos

As desvantagens do congelamento de alimentos são as alterações provocadas nos mesmos. Dentre estas alterações, é possível citar as modificações físicas, como a desidratação que provoca alterações na textura, as alterações físico-químicas que se devem essencialmente à concentração dos líquidos e provocam a desnaturação de proteínas, e as modificações químicas e bioquímica, que são geralmente de origem enzimática, e que causam oxidações, hidrólises e peroxidação, modificando a cor e o sabor do alimento. Algumas alterações, como da textura do produto, por exemplo, são provocadas devido ao processo de congelamento. Outras, tais como as mudanças na cor,

sabor e perda de nutrientes, estão relacionadas às condições de estocagem (INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO, 1990).

Os principais parâmetros que influenciam a qualidade de um alimento congelado são: a natureza do produto, a sua qualidade no momento do congelamento, as operações de preparação e de congelamento, a embalagem, a temperatura de armazenamento e as suas variações e o tempo de estocagem (INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO, 1990). Em vegetais, o pré-tratamento influencia nas modificações durante o armazenamento. O branqueamento faz-se necessário para inativar enzimas que continuam com a sua atividade mesmo em temperaturas de congelamento. Em frutas, a ação enzimática é controlada pela redução do oxigênio, adição de ácidos e dióxido de enxofre (HELDMAN; HARTEL, 1998).

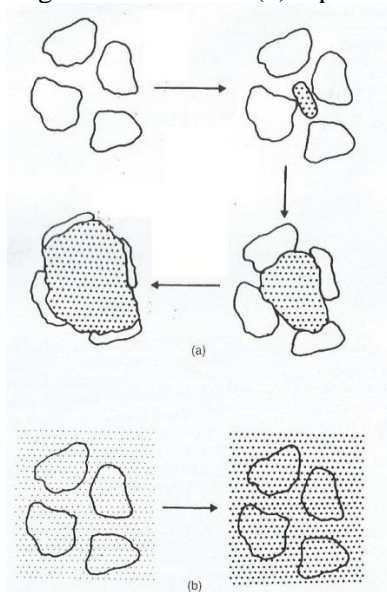
Um dos fatores de qualidade mais afetados pelo congelamento é a textura do produto. A diminuição da capacidade de retenção de água das células devido ao crescimento dos cristais de gelo é o maior efeito perceptível e é um dos principais motivos da mudança na textura. Além disso, a água interna das células direciona-se para a formação dos cristais de gelo extracelulares. Isto ocorre devido à pressão de vapor de água maior no interior das células, já que a formação dos cristais se inicia na parte extracelular. Essa transferência de massa causa desidratação e danos permanentes devido ao aumento de concentração de sólidos e deformação das células. A forma e a rigidez originais das células não são recuperadas durante o descongelamento e, como consequência, tem-se o amolecimento do produto. Os danos diferem entre as variedades de tecidos, mas, de modo geral, quanto mais rápido o congelamento, menos danos os tecidos sofrem (FELLOWS, 2007; HELDMAN; HARTEL, 1998; JAMES; JAMES, 2014).

Os tecidos vegetais, em sua maioria, são semi-rígidos e apresentam menor resistência à expansão causada pela formação dos cristais de gelo (JAMES; JAMES, 2014). Os tecidos animais, por sua vez, sofrem menos devido ao congelamento por terem estrutura mais fibrosa e mais flexível o que minimiza o rompimento. No entanto diferenças entre a variedade da matéria-prima e o grau de controle dos processos antes do congelamento tem efeito significativo nas mudanças ocorridas por causa do congelamento. O volume do gelo é 9% maior do que o da água pura. O grau de expansão varia de acordo com o conteúdo de umidade, o arranjo celular, os espaços intercelulares, concentração de solutos e componentes cristalizados. Quando o

congelamento ocorre de forma rápida, ocorre a formação de pequenos cristais de gelo tanto intercelular como intracelular. Esses cristais menores não rompem as paredes celulares e não formam gradiente de pressão de vapor d'água. Desta forma, a textura dos alimentos sofre menos danos. Porém altas taxas de transferência de calor podem causar estresse nos tecidos e, como consequência, induzir rompimento ou rachaduras (FELLOWS, 2007; HELDMAN; HARTEL, 1998).

A Figura 3.7 esquematiza o efeito do congelamento rápido e lento nos tecidos vegetais. O processo representado na letra “a” indica o efeito do congelamento lento nas células: a formação dos cristais de gelo inicia-se na parte extracelular e estes vão aumentando de tamanho conforme o congelamento avança; a água intracelular migra para a parte externa das células e provoca o murchamento das mesmas, conforme ilustrado na figura. A letra “b” representa o efeito do congelamento rápido nas células: formam-se pequenos cristais de gelo tanto na água extracelular como na intracelular e as células se mantêm sem alteração de volume.

Figura 3.7- Efeito do congelamento lento e rápido nas células vegetais onde (a) representa o efeito de congelamento lento e (b) rápido nas células.



Fonte: Meryman (1963) Apud Fellows (2007).

No entanto a taxa de congelamento não é um fator que altera significativamente as questões sensoriais de todo os produtos. James e James (2014) e Fellows (2007) classificam os alimentos em quatro grupos de acordo com a sensibilidade em relação à taxa de congelamento:

a) produtos cuja estrutura praticamente não é afetada pela taxa (produtos com pouca umidade, como por exemplo, produtos cárneos com alto teor de gordura;

b) produtos cuja estrutura sofre alteração com taxas de até 0,5 ~ 1 °C/min, tais como peixes, carnes magras e refeições prontas com alto teor de amido (taxas maiores do que esta não afetam significativamente os produtos);

c) produtos cuja estrutura sofre alteração com taxas de congelamento de até 3 ~ 6 °C/min, tais como frutas, produtos à base de ovos e molhos espessados com farinha (taxas maiores do que esta não afetam significativamente os produtos);

d) produtos cuja estrutura é sensível a altas taxas de congelamento, tais como frutas e vegetais como framboesa, tomate e pepino. Estes são produtos que apresentam melhora na qualidade com as altas taxas de congelamento, porém a temperatura baixa resulta na desestruturação dos tecidos.

Em relação aos produtos vegetais, é muito mais difícil congelar frutas do que verduras. Tanto frutas como verduras sofrem rompimento dos tecidos devido à formação dos cristais de gelo, porém as verduras possuem uma estrutura fibrosa que mantém os tecidos unidos após descongelamento. Além disso, as frutas possuem melhor aroma, coloração e textura quando maduras, estágio no qual a manipulação é mais difícil, visto que se tornam mais frágeis. Muitas verduras são consumidas cozidas o que permite o pré-tratamento como o branqueamento (POTTER; HOTCHKISS, 1999).

Alterações na temperatura durante a estocagem também podem causar danos aos tecidos. A tendência ao elevar a temperatura do produto é que pequenos cristais derretam. Após o abaixamento da temperatura, esta água tende a se juntar aos cristais já existentes, aumentando o tamanho do cristal e diminuindo o número deles (HUNG; ERICKSON, 1997). Este fenômeno chama-se recristalização, sendo que, existem quatro tipos: recristalização isomássica, recristalização combinante ou por contato, recristalização migratória e a recristalização por pressão.

Na recristalização isomássica, ocorre a mudança no formato do cristal, resultando na diminuição da relação superfície/volume. Na recristalização combinante, dois cristais de gelo adjacentes unem-se para formar um cristal maior e de menor energia. Como consequência, tem-se menor número de cristais e com maior tamanho. Esse tipo de recristalização não pode ser evitada, porém tem a sua importância reduzida quando o congelamento for conduzido de forma lenta. Na recristalização migratória, tem-se uma diminuição do número de cristais e aumento do tamanho de um cristal,

assim como na recristalização combinante, devido à migração de água de um cristal para o outro. A recristalização migratória ocorre devido a flutuações da temperatura de armazenamento. A recristalização por pressão ocorre quando se aplica uma força a um grupo de cristais: aqueles que têm seu eixo principal paralelo à direção da força crescem a partir dos outros cristais que não possuem a mesma orientação. O crescimento é proporcional à força aplicada. Para evitar esse tipo de recristalização, não se deve submeter produtos congelados a pressões (FELLOWS, 2007; HELDMAN; HARTEL, 1998; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Outros problemas de estocagem são a “queimadura pelo frio” e a névoa em embalagem. A queimadura pelo frio ocorre pela perda de água da superfície por sublimação. De modo geral, a umidade do ar das câmaras de armazenamento é baixa devido à condensação da água. Essa baixa umidade provoca um gradiente de concentração de vapor entre a superfície do produto e o ar da câmara de estocagem, provocando uma desidratação no produto. Como resultado, tem-se uma camada fibrosa ressecada com aparência de queimada. Este tipo de problema ocorre quando o produto fica exposto ao ambiente da câmara e não está bem embalado. A névoa em embalagem ocorre devido à perda de líquido do produto que se deposita na embalagem e congela devido a variações de temperatura. O uso de embalagens adequadas e controle de temperatura eliminam ambos os problemas (FELLOWS, 2007; HELDMAN; HARTEL, 1998; JAMES; JAMES, 2014).

De modo geral, a cor, o sabor e a degradação de nutrientes não são influenciados significativamente pelo processo de congelamento em si, mas pelas condições de estocagem. Via de regra, quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, menos mudanças ocorrem. Porém deve ser avaliado o custo de estocagem a baixas temperaturas, visto que quanto mais baixa a temperatura maior é o custo. Aceita-se que o armazenamento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  garante um alimento seguro e com poucas alterações sensoriais (FELLOWS, 2007; HELDMAN; HARTEL, 1998).

Em vegetais não branqueados a polifenoloxidase causa escurecimento e as lipogenases produzem sabor e aroma indesejáveis em lipídeos e a degradação de carotenoides (POTTER; HOTCHKISS, 1999). Quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, mais tempo leva para se perceber as primeiras alterações (FELLOWS, 2007). O aroma (*flavor*) indesejável aparece geralmente em frutas e hortaliças que não

passam por branqueamento e que oxidam lipídeos insaturados na presença de lipases ou de lipoxigenase (INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO, 1990).

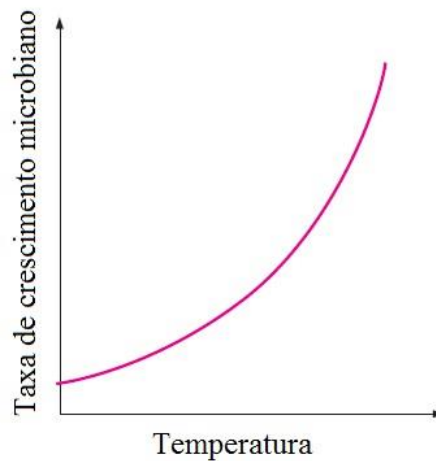
Em relação às alterações de cor, a mais notável é o escurecimento de alimentos resultante da oxidação enzimática de fenólicos. Mesmo sob baixas temperaturas, a ação dessas enzimas continua ocorrendo de forma lenta (INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO, 1990). As antocianinas são afetadas durante o congelamento e causam o escurecimento de frutas avermelhadas (GRUDA; POSTOLSKI, 1986). A clorofila é lentamente degradada para feofitina marrom devido ao rompimento dos cloroplastos e cromoplastos. A retenção da clorofila está relacionada com a temperatura de estocagem, quanto mais baixa a temperatura de estocagem, maior a retenção da clorofila. Em frutas, a cor das antocianinas é alterada devido a mudanças no pH das soluções concentradas (FELLOWS, 2007).

As mudanças dos atributos de qualidade dos alimentos, durante a estocagem está relacionada à temperatura de armazenamento. Quanto maior a temperatura, menor a retenção da qualidade, ou seja, mais mudanças ocorrem. A vida de prateleira de produtos congelados em sua maioria é determinada pela primeira mudança significativa em algum dos parâmetros de qualidade. As alterações de cor, geralmente, são mais perceptíveis que as alterações de sabor. Quanto maior a temperatura de armazenamento, mais rápido essas mudanças são perceptíveis (FELLOWS, 2007; HELDMAN; HARTEL, 1998).

Temperaturas um pouco abaixo da temperatura de congelamento não garantem a inibição da atividade microbiana. O congelamento não é uma técnica destrutiva de micro-organismos, por isso a qualidade microbiológica do alimento depois de congelado depende do seu estado antes do congelamento. Algumas bactérias (em sua maioria gram-negativas) são eliminadas durante o congelamento, porém um grande número de micro-organismos é resistente ao processo. O choque térmico, o crescimento dos cristais de gelo e o aumento da fração de solutos na fase não congelada são os fatores causadores da destruição dos micro-organismos. Porém a sensibilidade em relação à temperatura varia com o tipo de micro-organismo. Temperaturas de estocagem entre -4 e -10 °C têm maior efeito letal em micro-organismos do que a temperaturas mais baixas (entre -15 e -30 °C). Porém aqueles micro-organismos que sobrevivem ao efeito letal da temperatura, proliferam-se mais sob temperaturas mais próximas de 0 °C. Conforme é apresentado por Çengel e Ghajar (2012) na Figura 3.8 a taxa de

crescimento microbiano varia em função da temperatura de armazenamento, sendo que, quanto mais baixa a temperatura, menos favorável o meio se torna para a proliferação. As toxinas, se produzidas antes do congelamento, não são afetadas pela diferença de temperatura. Porém, em temperaturas por volta de  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a atividade microbiana dos micro-organismos sobreviventes é praticamente nula, visto que as condições do alimento congelado não são substratos ideais para o crescimento dos mesmos (FELLOWS, 2007; HELDMAN; HARTEL, 1998; INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO, 1990; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Figura 3.8- Taxa de crescimento microbiano em função da temperatura de estocagem de alimentos congelados.



Fonte: Adaptado de ÇENGEL; GHAJAR (2012).

### 3.3 Os Crioprotetores

A seguir, são apresentados os crioprotetores mais comumente utilizados e é feita uma breve revisão sobre os mecanismos de ação dos mesmos. Também se faz uma revisão sobre a trealose, o crioprotetor utilizado no presente trabalho.

#### 3.3.1 Tipos de Crioprotetor e Mecanismos de Ação

O termo crioprotetor foi criado pela Sociedade de Criobiologia, em 1965, para designar o aditivo que oferece à célula uma sobrevivência após o descongelamento

maior do que a sobrevivência dela na mesma situação, sem a sua presença. Antes disso, esses aditivos eram chamados criófilos ou moderadores de soluto. Os primeiros estudos com crioprotetores foram publicados no século XIX e início do século XX por biólogos que estudavam o congelamento e a resistência ao frio, principalmente de plantas (FULLER, 2004).

A ação dos crioprotetores em produtos congelados está relacionada à mudança na formação dos cristais de gelo e à modificação do ponto de congelamento e de transição vítrea. Os crioprotetores, principalmente os dissacarídeos, aumentam a temperatura de transição vítrea, favorecendo a estabilidade do produto sem congelamento. Costuma-se dividir os crioprotetores de acordo com o seu mecanismo de ação: agentes de nucleação de gelo, proteínas anticongelamento e solutos compatíveis (FULLER, 2004).

Os agentes de nucleação de gelo interagem com a água livre e modificam a formação dos cristais, evitando o crescimento deliberado de gelo em alguns locais. São encontrados em plantas, insetos e bactérias. Apesar de serem reconhecidos como crioprotetores, os agentes de nucleação de gelo, possuem efeito mais pronunciado em células avulsas e não tanto em tecidos (FULLER, 2004).

As proteínas anticongelamento, também conhecidas como proteínas de histerese térmica, diminuem o ponto de congelamento sem alterar o ponto de fusão. Elas ligam em sua superfície pequenos cristais de gelo, impedindo o crescimento dos cristais e a recristalização. São encontradas em fungos, bactérias, plantas, insetos e peixes marinhos polares. São divididas em tipos I, II, III e IV, de acordo com as suas características estruturais (FULLER, 2004). Estudos mostram também que as proteínas anticongelamento interagem com as moléculas de água, interferindo no crescimento dos cristais de gelo. Estas propriedades são características gerais das proteínas anticongelamento, mas o mecanismo de ação varia de acordo com a proteína (CREVEL; FEDYK; SPURGEON, 2002; LI; LIANG, 2015).

As proteínas anticongelamento vêm recebendo muita atenção por apresentarem bons resultados como crioprotetores. Essas proteínas foram inicialmente identificadas em peixes que viviam em condições glaciais. Tais proteínas baixam o ponto de congelamento do sangue destes peixes abaixo da temperatura da água em que vivem. Posteriormente, tais proteínas foram encontradas em uma grande variedade de seres vivos como fungos e bactérias, além de vegetais, como alho, aveia, cenoura, batata,



triticale, centeio e canola. É grande a variedade de proteínas anticongelamento já identificadas; o desafio, entretanto, é a extração e a purificação das mesmas, além da identificação de qual tipo tem melhor aproveitamento em cada material (CREVEL; FEDYK; SPURGEON, 2002; GRIFFITH; EWART, 1995).

Os solutos compatíveis são sintetizados por várias plantas e organismos quando submetidos a algum “stress”. Tais solutos são geralmente açúcares e açúcares álcoois, como a trealose e o glicerol, que interagem com a água livre, alterando a conformação dos cristais de gelo, e também com as paredes celulares, impedindo a desidratação das células. O desafio é potencializar a adição desses açúcares em estruturas que não as produzem a fim de obter seus benefícios crioprotetores.

Os crioprotetores também podem ser divididos em crioprotetores intracelulares e extracelulares. Os intracelulares possuem baixa massa molar e propriedades anfipáticas – apresentam uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica - conseguem permear as células e são efetivos em minimizar os danos causados pelo congelamento lento- como exemplos, têm-se o sulfato de dimetilo ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ) e o glicerol. Os crioprotetores extracelulares atuam formando uma proteção em torno das células, minimizando, assim, os efeitos de desidratação devido aos processos de congelamento (MOTTA et al., 2014).

A utilização de crioprotetores em áreas como de reprodução, genética, medicina e biologia é bastante estudada e desenvolvida e destina-se, principalmente, à conservação de espermatozoides (GARDE et al., 2008; HORVÁTH; MISKOLCZI; URBÁNYI, 2003; JAFAROGHLI et al., 2011; MORRELL; HODGES, 1998; NAING et al., 2010; SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004; SZTEIN et al., 2001; TUNCER et al., 2011; YILDIZ et al., 2000), óvulos. (HUANG et al., 2008; KOSHIMOTO; MAZUR, 2002; SOMFAI et al., 2015), embriões (MALO et al., 2010; RAYOS et al., 1994; SAITO et al., 1994), sementes vegetais (HUEHNE; BHINIJA, 2012), tecidos e células animais (CAMPBELL; BROCKBANK, 2011; LEE et al., 2014; LIN; ZHANG; RAWSON, 2009).

Vários estudos apresentam bons resultados com o uso de açúcares em diferentes materiais congelados. Yildiz et al. (2000) conseguiram reduzir os danos em espermatozoides congelados com a adição de galactose, lactose, trealose, maltose e sacarose e a atividade dos mesmos (mobilidade *versus* sobrevivência do espermatozoide *versus* taxa normal de cromossomos) com a adição de trealose, xilose e frutose. Huehne e Bhinija (2012) mostraram que a viabilidade de sementes de orquídeas após

descongelamento é aumentada com a adição de meso-inositol, manitol e glicose. Somfai et al. (2015) obtiveram bons resultados com a utilização de sacarose e trealose na criopreservação de óvulos suínos.

O mecanismo de ação dos carboidratos na preservação das células em relação aos danos causados pelo congelamento e descongelamento está relacionado com a ligação dos açúcares e os fosfolípidos da membrana celular. Ao se ligarem à membrana celular, os açúcares formam a barreira protetora que impede a desidratação das células (BAKÁS; DISALVO, 1991; PATIST; ZOERB, 2005).

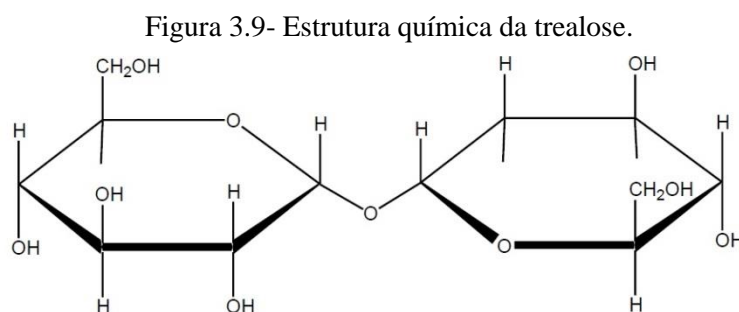
Os sacarídeos também possuem a habilidade de formar vidros (permanecer no estado vítreo), que possuem alta viscosidade, baixa mobilidade e aumentam a estabilidade do material a ser preservado. No estado vítreo, os alimentos parecem sólidos, porém sua estrutura é desordenada como em um líquido e são capazes de suportar seu próprio peso. Acima da temperatura de transição vítrea, o sistema não suporta seu próprio peso e ocorre o colapso na estrutura; abaixo desta temperatura, os alimentos tendem a ser mais estáveis, visto que a biomolécula fica severamente restrita em relação ao seu relaxamento estrutural. Há uma relação forte entre a temperatura de transição vítrea dos alimentos e a estabilidade/vida de prateleira dos mesmos. A água tem efeito significativo na transição vítrea dos alimentos, agindo como um plastificante e diminuindo a temperatura de transição vítrea. A Equação (3.1), chamada Equação de Gordon-Taylor, determina a temperatura de transição vítrea,  $T_g$ , onde  $X_s$  e  $X_w$  são as frações mássicas de sólidos e de água respectivamente,  $T_{g,s}$  e  $T_{g,w}$  são as temperaturas de transição vítrea dos sólidos e da água respectivamente e  $K$  é uma constante. Em contrapartida, não se sabe por que algumas substâncias com alta temperatura de transição vítrea como o dextran não possui efeito crioprotetor tão pronunciado (ALLISON et al., 1999; PATIST; ZOERB, 2005).

$$T_g = \frac{X_s T_{g,s} + K X_w T_{g,w}}{X_s + K X_w} \quad (3.1)$$

A associação da transição vítrea com a porção não congelada concentrada do alimento vem recebendo atenção. Em alimentos congelados há redução da perda de qualidade (reações enzimáticas e recristalização) quando a porção não congelada concentrada está na fase vítrea (HUNG; ERICKSON, 1997).

### 3.3.2 A Trealose

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose unidas através de uma ligação glicosídica alfa, alfa-1,1. Na Figura 3.9 é apresentada a estrutura da trealose.



Fonte: PATIST; ZOERB (2005).

A trealose possui 45% do poder de doçura da sacarose, podendo ser adicionada a alimentos sem necessariamente adoçá-los (MITCHELL, 2012). Sua estrutura é muito estável, mesmo sob pH baixo e elevadas temperaturas. Estudos demonstram que soluções a 4% de trealose, submetidas a valores de pH entre 3,5 e 10, aquecidas por 24 h a 100 °C, não apresentaram degradação da trealose (HIGASHIYAMA, 2002). Na Tabela 3.4, são apresentadas algumas propriedades deste açúcar.

Na natureza, a trealose é encontrada em cogumelos, que possuem de 10 a 25% deste açúcar em massa, em plantas e em alguns micro-organismos, principalmente os anidrobióticos, que são organismos capazes de sobreviver em presença de pouca água. É encontrada, também, em algumas espécies de plantas, como na cana-de-açúcar e no girassol. A trealose tem a função de proteger os organismos de vários estresses como desidratação e variações de temperatura (HIGASHIYAMA, 2002; WINGLER, 2002) e está presente em seres que conseguem permanecer em estado desidratado por vários anos e que, após reidratação, conseguem voltar à atividade normal de crescimento e desenvolvimento, os chamados seres criptobióticos. Em relação à proteção dos danos causados por períodos de estresse, a sacarose consegue produzir o mesmo efeito protetor nos organismos, porém a quantidade necessária de sacarose é muito maior (MÜLLER; BOLLER; WIEMKEN, 1995).

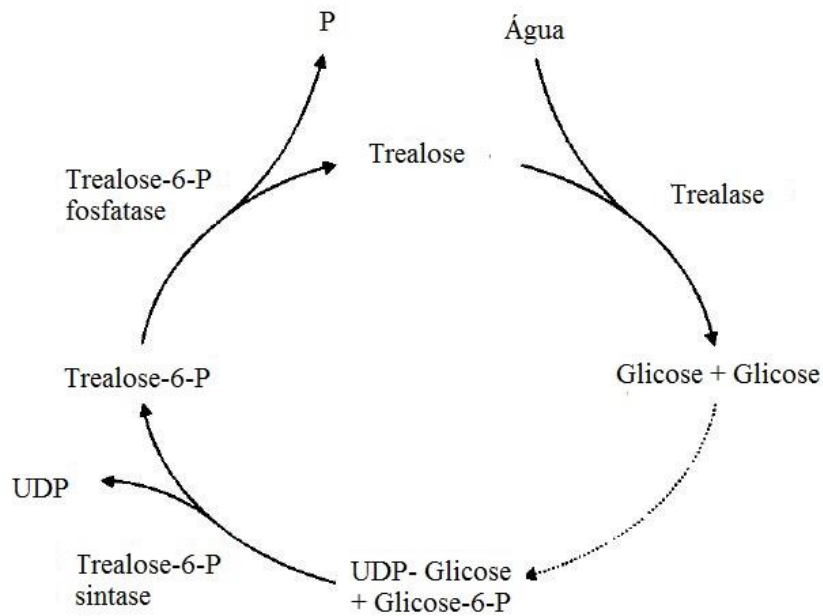
Tabela 3.4- Propriedades químicas da trealose.

<b>Propriedade</b>	<b>Condição</b>	<b>Valor</b>
Ponto de fusão (°C)	di-hidratada	97
	anidra	210,5
Calor de fusão (kJmol <sup>-1</sup> )	di-hidratada	57,8
	anidra	57,8
Solubilidade (g/100g)	Em H <sub>2</sub> O a 20 °C	68,9 g/100 g
Estabilidade do pH da solução	pH: 3,5 – 10 a 100 °C por 24 h	> 99 %
Estabilidade térmica da solução	A 120 °C por 90 min	> 99%

Fonte: Adaptado de HIGASHIYAMA (2002).

Especialmente nos fungos, a trealose é produzida em duas etapas a partir da UDP- glicose e da glicose-6-P. A degradação dá-se através da enzima trealase que está presente, assim como as enzimas de síntese no citosol (MÜLLER; BOLLER; WIEMKEN, 1995). A Figura 3.10 mostra o ciclo de síntese e degradação de trealose na natureza. A trealose está presente também em organismos que não a produzem, como os mamíferos.

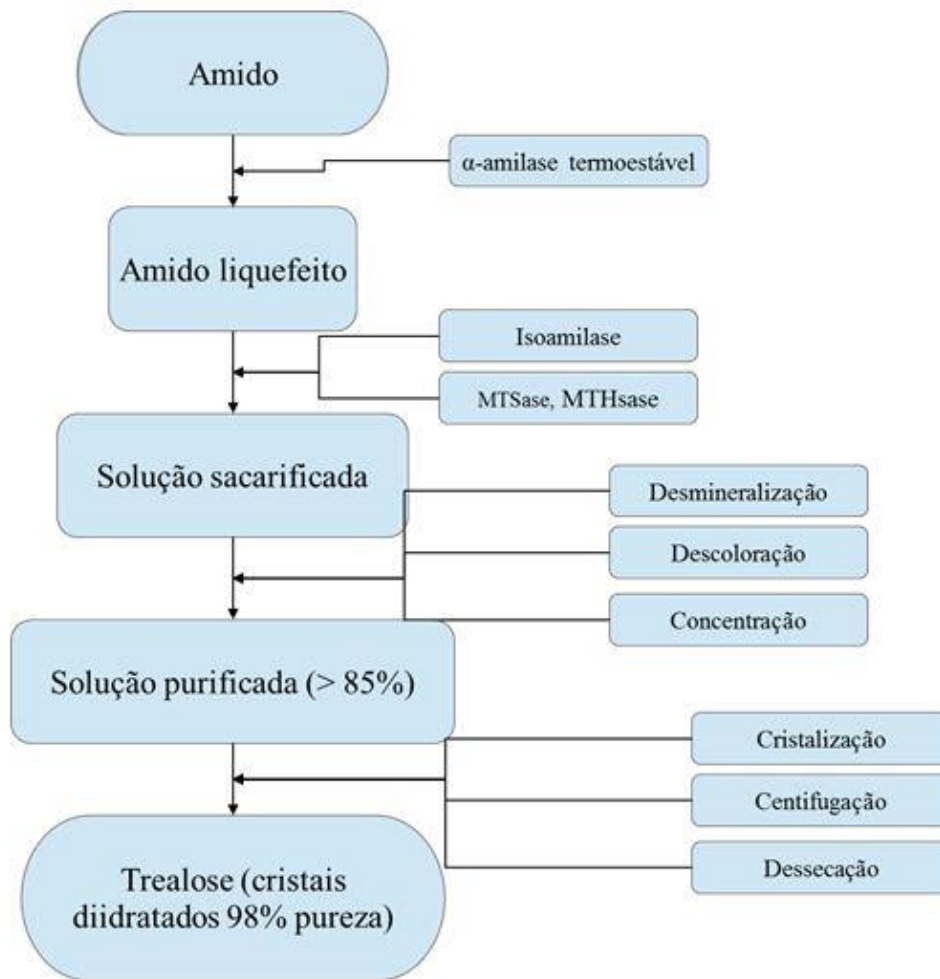
Figura 3.10- Ciclo de síntese e degradação da trealose na natureza.



Fonte: Adaptado de MÜLLER; BOLLER; WIEMKEN (1995).

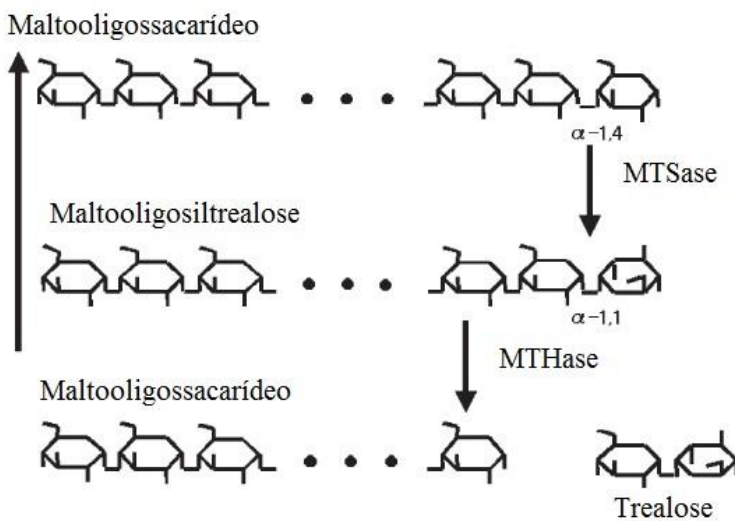
Industrialmente, sua utilização é interessante, visto que não participa das reações de Maillard. O método convencional de produção da trealose é a partir de leveduras, sendo um processo pouco rentável e muito caro. Alternativamente, a trealose pode ser obtida a partir de processo enzimático com amido. Este processo baseia-se em duas etapas: na primeira, a enzima malto-logigosiltrealose sintase (MTSase) transforma a ligação alfa-1,4 em ligações alfa-1,1, produzindo malto-oligosiltrealose; na etapa seguinte, a enzima malto-oligosiltrealose trealohidrolase (MTHase) libera moléculas de trealose da cadeia. As Figura 3.11 e Figura 3.12 mostram a ação das enzimas e o fluxograma da produção de trealose a partir do amido.

Figura 3.11- Síntese de trealose a partir do amido.



Fonte: Adaptado de HIGASHIYAMA (2002).

Figura 3.12- Esquema da obtenção de trealose a partir de oligossacarídeos.



Fonte: Adaptado de HIGASHIYAMA (2002).

De acordo com Wingler (2002), as enzimas que sintetizam a trealose na natureza, trealose-fosfato sintase (TPS) e a trealose-fosfato fosfatase (TPP) são encontradas em vegetais como o arroz, a soja e o tomate.

A ação crioprotetora da trealose dá-se devido a sua alta temperatura de transição vítrea, pela sua capacidade de se ligar às paredes celulares e pela sua grande afinidade com a água. Como já exposto na seção 3.3.1, a temperatura de transição vítrea está relacionada com a estabilidade dos alimentos. A trealose possui a temperatura de transição vítrea mais alta entre os açúcares comumente utilizados nos alimentos. A Tabela 3.5 mostra a temperatura de transição vítrea dos açúcares mais comumente encontrados e utilizados (PATIST; ZOERB, 2005).

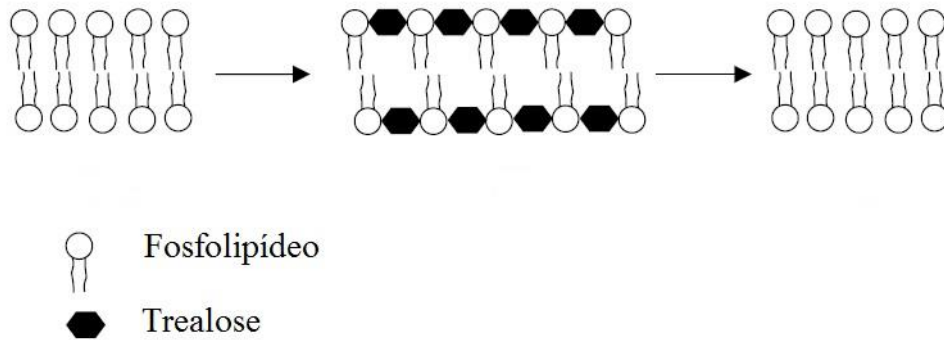
Tabela 3.5- Temperatura de transição vítrea de alguns açúcares.

<b>Açúcar</b>	<b>Temperatura de transição vítrea do composto anidro (°C)</b>
trealose	115
maltose	84
sacarose	60
glicose	37
frutose	5
ribose	-22

Fonte: Adaptado de PATIST; ZOERB (2005).

A Figura 3.13 ilustra outro mecanismo de ação crioprotetora da trealose em processos de secagem e congelamento/descongelamento. Nesta figura, o açúcar liga-se aos fosfolipídeos das paredes celulares durante a perda de água, reduzindo as forças de Van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonos. Após a reidratação, as membranas permanecem intactas, como apresentado na figura.

Figura 3.13- Esquema do mecanismo de ação da trealose durante perda e ganho de água.



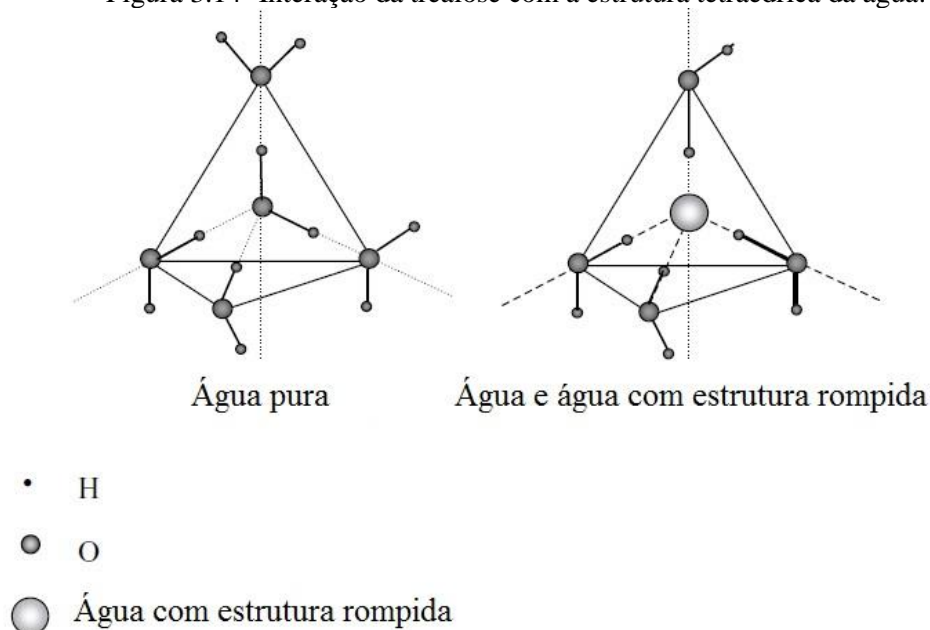
Fonte: Adaptado de PATIST; ZOERB (2005).

Em alguns casos, a sacarose e a maltose conseguem produzir o mesmo efeito crioprotetor às células, porém há a necessidade de quantidades muito maiores destes açúcares; os três açúcares são isômeros, possuem a mesma fórmula e mesma massa molar, no entanto são estruturalmente diferentes. A trealose possui maior flexibilidade entre os dois monômeros e isso permite que ela se conforme com os grupos polares de macromoléculas e interaja melhor com os fosfolípidos (PATIST; ZOERB, 2005).

A efetividade da trealose como crioprotetor dá-se também pelo fato de ser ótima formadora de pontes de hidrogênio, que está relacionada à flexibilidade de sua estrutura, além da sua capacidade de romper a estrutura tetraédrica da água, e reduzir assim, a quantidade de água livre. Visto que a formação dos cristais de gelo causa danos irreparáveis nas paredes celulares, a preservação das células através da adição dos açúcares está relacionada à ruptura da ligação tetraédrica da água e, como consequência, a redução da água livre que viria a formar cristais de gelo. A Figura 3.14 mostra as mudanças estruturais da água ao se ligar com a trealose (PATIST; ZOERB, 2005).



Figura 3.14- Interação da trealose com a estrutura tetraédrica da água.



Fonte: Adaptado de PATIST; ZOERB (2005).

De modo geral, agentes que rompem a molécula de água consomem calor, gerando uma reação endotérmica. Os calores de solução da trealose, maltose e sacarose são apresentados na Tabela 3.6. Patist e Zoerb (2005) relacionam a habilidade da trealose em romper a molécula de água e, por consequência, sua superioridade como crioprotetor, com seu calor de solução maior do que de outros açúcares.

Tabela 3.6- Calor de solução da trealose, maltose e sacarose.

Dissacarídeo	$\Delta H_{sol}$ (kJ/mol)
trealose	19,1
maltose	15,6
sacarose	5,95

Fonte: Adaptado de PATIST; ZOERB (2005).

O efeito crioprotetor da trealose foi estudado em diferentes materiais, tanto de origem animal, quanto de origem vegetal. Berlinguer et al. (2007) estudaram o efeito crioprotetor da trealose em células de ovinos durante o processo de vitrificação, obtendo resultados positivos em relação à preservação das paredes celulares. Tonieto et al. (2010) verificaram que a trealose melhorou a viabilidade das células de sêmen de carneiro após descongelamento.

El-Sheshtawy, Sisy e El-Nattat (2015) estudaram o efeito da sacarose e da trealose nas células de sêmen de touro congeladas. Os autores verificaram que soluções com elevadas concentrações de açúcares (200 mM/L) reduziram a integridade das células, enquanto que soluções com concentrações mais moderadas (50 a 100 mM/L) melhoraram a qualidade das células após o descongelamento.

Erdag et al. (2002) testaram a adição de trealose (0,5 M) em soluções crioprotetoras contendo Me<sub>2</sub>SO a 10% (v/v) e compararam a viabilidade de células de tecidos de fetos tratados com soluções de Me<sub>2</sub>SO e de glicerol. Por fluorescência, verificaram que a integridade das células dos tecidos após descongelamento aumentou quando tratadas com as soluções contendo a trealose. O estudo demonstrou que a adição de trealose, crioprotetor extracelular, combinado com o Me<sub>2</sub>SO, crioprotetor intracelular, tem efeito significativo na preservação das células congeladas.

Diferentes concentrações de trealose adicionadas através de microinjeções em zigotos de rato (intracelular) foram investigadas em relação à viabilidade e desenvolvimento das células por Eroglu et al. (2003). Concentrações acima de 0,15 M de trealose prejudicaram o desenvolvimento das células, visto que a diferença de concentração de sólido solúveis dentro e fora da célula torna-se muito elevada.

A trealose e a sacarose mostraram-se bons crioprotetores durante o congelamento e descongelamento de células de cordão umbilical segundo Rodrigues et al. (2008). A quantidade de Me<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, comumente utilizado como crioprotetor e que está associado a reações adversas em pacientes, pode ser reduzida com a adição dos açúcares.

Bakás e Disalvo (1991) demonstram em um estudo com gema de ovo que o Ca<sup>2+</sup> diminui a efetividade da trealose e de outros açúcares por competir com eles e ligar-se a lipídeos da membrana celular. Os ensaios mostraram que a ação crioprotetora da trealose diminuiu significativamente quando a relação molar entre Ca<sup>2+</sup> e trealose foi maior que 0,25.

Bhandal, Hauptmann e Widholm (1985) verificaram a viabilidade de células de cultura de cenoura, tabaco e nicotina pré-tratadas com soluções de trealose e dimetilsulfóxido (DMSO) após descongelamento. Os autores observaram que a trealose só foi efetiva quando houve penetração no interior das células. Somente soluções com elevadas concentrações de trealose (40%) apresentaram diferença significativa na preservação celular.

Hincha (1989) verificou que a trealose, quando adicionada em baixas concentrações (2 mM), possui maior efeito crioprotetor em células de espinafre que a mesma quantidade de sacarose, quando submetidas ao processo de congelamento e posterior descongelamento. A ação da trealose, segundo o autor, dá-se pela redução da permeabilidade das membranas que se ligam à trealose e reduzem o fluxo de líquidos durante o congelamento e descongelamento.

Nos seres humanos, a trealose é absorvida no intestino delgado após a hidrólise promovida pela enzima trealase. De acordo com Mitchell (2012), existem poucos relatos sobre intolerância à trealose, sendo um número menor que 1% da população. As reações são similares à intolerância à lactose (que é diagnosticada em cerca de 60% da população). O pico de glicose e de insulina devido ao seu consumo é muito menor e mais retardado do que da maltose, assim como sua taxa oxidativa. De acordo com Richards et al. (2002), ela é consumida com a ingestão de mel (0,1 a 1,9%), cerejas (<10 a 391 ml/L), cogumelos (8 a 17%), camarões (0,5%), cervejas (0,01 a 5%) e produtos de panificação que sofrem fermentação (15-20%).

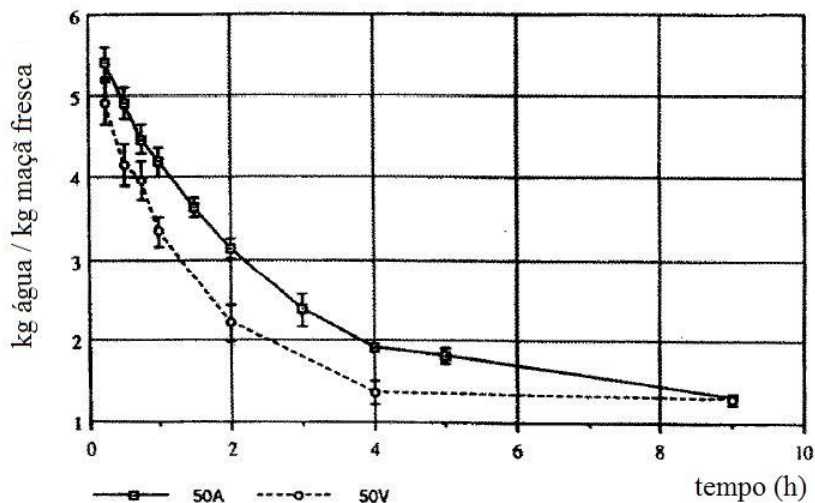
A primeira legislação que permitiu o uso da trealose como crioprotetor foi instituída no Reino Unido, em 1991, que aprovou a adição de até 5%. No Japão, foi aprovada como aditivo alimentar em 1995. Nos Estados Unidos, foi reconhecida como segura (GRAS- *generally recognised as safe*) e, em 2001, a US FDA (*Food and Drug Administration*) declarou não ter objeção em relação ao reconhecimento da GRN 000045 emitida pela GRAS. No ano de 2000, a JECFA (*Joint Expert Comitee on Food Assitives*) revisou e aprovou a trealose como ADI (*acceptable daily intake*). Na Europa, foi reconhecida como novo ingrediente alimentar em 2001 (MITCHELL, 2012). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) divulgou a lista de novos ingredientes aprovados em 2009, instituindo que os alimentos que contiverem mais de 50 g de trealose em uma porção única de consumo devem apresentar no rótulo a seguinte informação: “Este produto pode ter efeito laxativo”. Além disso, os produtos dispensados de registro que utilizarem trealose como aditivo continuam dispensados de registro (ANVISA, 2016).

### 3.4 Impregnação a Vácuo

O método de impregnação a vácuo já é utilizado industrialmente em outros segmentos, como na metalurgia. Porém, na indústria alimentícia, o método é pouco utilizado devido à falta de informações. Diferente de outros segmentos, o setor alimentício requer maior atenção, visto que a matéria-prima pode ser sensível ao método e além de tudo, deve-se produzir alimentos aptos para consumo em relação às condições higiênico-sanitárias, à legislação vigente e aos parâmetros nutricionais.

A impregnação a vácuo é um dos métodos mais rápidos para introduzir uma fase líquida em uma matriz sólida. O método consiste em remover o gás presente nos espaços intercelulares e introduzir um líquido externo devido à ação de mecanismos hidrodinâmicos (XIE; ZHAO, 2004). A transferência de massa durante o processo ocorre devido à diferença de pressão e não, devido à diferença de concentração, como ocorre na desidratação osmótica. O principal objetivo deste processo é introduzir substâncias com alguma finalidade específica que pode ser desde a salga de produtos, obtenção de produtos enriquecidos com nutrientes, probióticos ou a alteração de alguma propriedade dos tecidos (RADZIEJEWSKA-KUBZDELA; BIEGANSKA-MARECIK; KIDON, 2014). O método também é utilizado para promover a aceleração da desidratação osmótica de duas maneiras: desidratação osmótica sob vácuo (vacuum osmotic dehydration - VOD), que é conduzida totalmente sob pressão negativa, e a desidratação osmótica com pulso de vácuo (pulsed vacuum osmotic dehydration - PVOD), que é conduzida em um curto período de vácuo (de 5 a 10 min) e o restante sob pressão atmosférica (ZHAO; XIE, 2004). A Figura 3.15 mostra um comparativo entre os processos da desidratação osmótica de maçãs sob pressão atmosférica (50A) e sob vácuo (50V) a 50 °C.

Figura 3.15- Perda de água de maçã durante os processos de desidratação osmótica sob pressão atmosférica (50A) e sob vácuo (50V).



Fonte: Adaptado de FITO; PASTOR (1994).

A impregnação a vácuo, como se percebe na Figura 3.15 acelera o processo de desidratação, bem como outros processos de transferência de massa. A Tabela 3.7 compara os processos de impregnação a vácuo, desidratação osmótica sob pressão atmosférica e salga (e/ou adição de açúcar por métodos convencionais). A impregnação a vácuo, comparada a outros métodos de incorporação de sólidos e/ou retirada se mostra vantajosa em relação a tempo visto que dura minutos enquanto outros métodos envolvem horas ou até mesmo dias; o fato se deve às diferentes forças motrizes que impulsionam os processos (ZHAO; XIE, 2004).

Tabela 3.7- Comparação entre os processos de impregnação a vácuo, desidratação osmótica sob pressão atmosférica e salga.

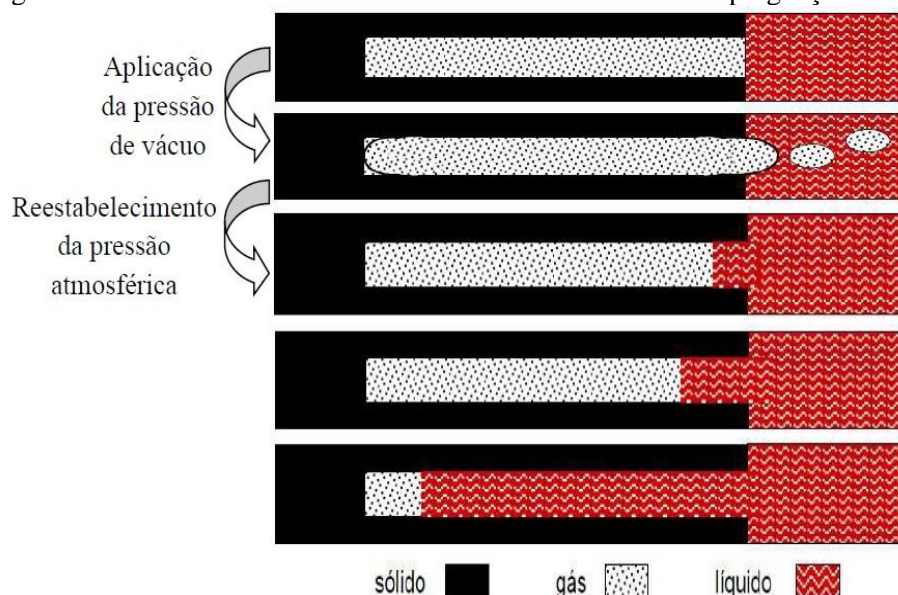
Processo	Escala de tempo	Força motriz	Mecanismo de controle
Impregnação a vácuo	Minutos	Gradientes de pressão e ação capilar	Mecanismos hidrodinâmicos
Desidratação osmótica sob pressão atmosférica	Horas	Ação capilar e diferença de concentração de sólidos	Deformação da matriz celular
Salga/ conserva	Dias/ semanas	Forças mecânicas e gradientes de pressão	Liberação de gás e preenchimento dos poros

Fonte: Adaptado de ZHAO; XIE (2004).

O tipo de solução utilizada depende do objetivo do processo. Soluções isotônicas, possuem concentração de sólidos solúveis próxima a da matriz; soluções hipertônicas apresentam concentração de sólidos solúveis menor que a matriz e soluções hipotônicas apresentam concentração de sólidos maior que a matriz. A impregnação de soluções isotônicas não provoca murchamento nem inchaço das células e é utilizada na obtenção de produtos minimamente processados. As soluções hipertônicas provocam o murchamento das células e são utilizadas nos processos de desidratação. De modo contrário, as soluções hipotônicas provocam o inchaço das células (ZHAO; XIE, 2004).

O processo de impregnação a vácuo ocorre em duas etapas após a imersão da matriz na solução líquida. Na primeira etapa, é imposta pressão de vácuo (-100 a -720 mmHg) por um curto período, chamado de tempo de impregnação. Durante este período, ocorre a expansão e a expulsão dos gases internos do alimento. Na segunda etapa, a pressão atmosférica é reestabelecida. Durante este tempo, chamado de tempo de relaxamento, ocorre o escoamento do líquido externo para dentro dos poros vazios (ZHAO; XIE, 2004). A Figura 3.16 esquematiza os mecanismos durante o processo de impregnação a vácuo.

Figura 3.16- Mecanismos de transferência de massa durante impregnação a vácuo.



Fonte: RODRIGUES (2013).

De acordo com Betoret et al. (2015), a distribuição dos poros e o tamanho deles influenciam no índice de impregnação ou incorporação. Além disso, o fenômeno

hidrodinâmico ocorre concomitante com o processo de deformação e relaxamento da matriz que está relacionado com as propriedades viscoelásticas da mesma.

Para Fito e Pastor (1994), a penetração da solução nos espaços intercelulares devido ao gradiente de pressão pode ser calculado através da Equação (3.2) onde  $\Delta P$  é o gradiente de pressão,  $\mu$  é a viscosidade da solução,  $z$  e  $D$  são o comprimento e o diâmetro do espaço intracelular (considerando um poro ideal) e  $x_v$  é o volume ocupado pelo líquido que varia em função do tempo ( $t$ ).

$$-\Delta P + \frac{32\mu z^2}{D^2} x_v \frac{\partial x_v}{\partial t} = 0 \quad (3.2)$$

O método de impregnação a vácuo é aplicado em diversos produtos e com finalidades distintas. As faixas de pressão e tempos de impregnação e de relaxamento variam de acordo com a matriz, solução a ser impregnada e finalidade da aplicação. De acordo com Zhao e Xie (2004), soluções de 20 a 50 °Brix são utilizadas na obtenção de produtos vegetais minimamente processados. Para que ocorra a desidratação, a solução deve apresentar concentração de 50 a 75 °Brix. A temperatura durante a impregnação varia entre 20 e 50 °C, sendo realizada, geralmente, a temperatura ambiente. Em relação ao tempo de vácuo, para vegetais utiliza-se, geralmente, de 5 a 30 min; o tempo de relaxamento varia de 10 a 20 min, para produtos minimamente processados e de poucos minutos até horas, para promover a desidratação.

A Tabela 3.8 apresenta os principais trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em diferentes matrizes, incluindo-se as condições de cada estudo.

Tabela 3.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos

Referência	Matriz	Solução impregnada	Objetivo	Pressão (mmHg)	Tempo impregnação (min)	Tempo de relaxamento (min)
(RENO; PRADO; RESENDE, 2011)	Morango	Glicose (20%), pectina (0; 1,5 e 3%) e cloreto de cálcio (0; 3 e 6%)	Melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento	-630, -380 e -125	240	Não informa
(XIE; ZHAO, 2004)	Morango	Xarope de milho (alto teor de frutose), pectina de alta metoxilação (71-75%), cálcio e lactato de zinco	Melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento. Enriquecer com cálcio e zinco	-710	15	30
(CRUVINEL. et al., 2009)	Abacaxi	Sacarose (20%) com pectina (0; 0,61; 1,5; 2,39 e 3%) e propionato de cálcio (0; 1,21; 3; 4,79 e 6%)	Melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento	-710; -690; -600; -570	240	30
(DYMEK et al., 2015)	Espinafre	Trealose ( 110g/L), sacarose (130g/L), glicose (100g/L) e manitol (80g/L)	Melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento	-645	1	5



Continuação da Tabela 2.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos

Referência	Matriz	Solução impregnada	Objetivo	Pressão (mmHg)	Tempo impregnação (min)	Tempo de relaxamento (min)
(OCCHINO et al., 2011)	Abobrinha	Maltodextrina (7,5- 9, 10%), NaCl (0- 5%) e CaCl <sub>2</sub> ( 0- 1000 mM)	Melhorar qualidades sensoriais de produto minimamente processado	-738	10	30
(CRUZ; VIEIRA; SILVA, 2009)	Agrião	Proteína anticongelamento tipo I (1 mg/ 100 mL)	Melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento	- 382, -435, -510, -637 e -760	5	Não informa
(PHOON et al., 2008)	Espinafre	Trealose (40% m/m)	Melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento	-645	20	150
(VELICKOVA et al., 2013)	Morango	Trealose e Proteína tipo I Três soluções: 12 g/100 g de trealose; 0,2 g/100 g de proteína e 0,2 g/ 100 g trealose+ 0,2 g/100 g de proteína.	Melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento	-645	14	Não informa
(RODRIGUES, 2013)	Goiaba	L. acidophilus e L. Plantarum (10%)	Produzir alimento de origem vegetal probiótico	-500	30	15

Continuação da Tabela 2.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos

Referência	Matriz	Solução impregnada	Objetivo	Pressão (mmHg)	Tempo impregnação (min)	Tempo de relaxamento (min)
(ANDRÉS-BELLO et al., 2015)	Filés de dourado	Bactérias ácido lácticas ( $10^7$ UFC/ mL) e nisina (2000IU/mL)	Prolongar a vida de prateleira	-722	5	5
(BAMPI; SCHMIDT; LAURINDO, 2014)	Carne bovina	Salmoura	Aumentar a eficiência no processo de salga	-710	20	340
(BELLARY et al., 2016)	Casca de melancia	Sacarose (30, 40, 50, 60 e 70 °Brix) contendo extrato de antocianinas 168,63 mg/ L	Desenvolver doce desidratado enriquecido com antocianinas	-610	30	240
(BETORET et al., 2003)	Maçã	Soluções probióticas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( $10^7$ UFG/ ml) ou <i>Lactobacillus casei</i> ( $10^7$ UFG/l)	Desenvolver snak desidratado probiótico	-722	10	10
(BETORET et al., 2005)	Maçã	Soluções de sacarose contendo cálcio (0 a 114,7 g/L) e ferro (0 a 2,98 g/L)	Desenvolver snak desidratado enriquecido com cálcio e ferro	-722	10	10

*Continuação da Tabela 2.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos*

<b>Referência</b>	<b>Matriz</b>	<b>Solução impregnada</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Pressão (mmHg)</b>	<b>Tempo impregnação (min)</b>	<b>Tempo de relaxamento (min)</b>
(BOEIRA, 2005)	Pêssego	Sacarose (0 a 60° Brix)	Pré-tratamento na obtenção de pêssego desidratado	-720	20	10
(PEREZ-CABRERA et al., 2011)	Pera	Sacarose (14 °Brix) contendo sorbato, 4-HR, EDTA e citrato combinados ou não com lactato de cálcio (1 g/100g)	Aumentar a vida de prateleira de pera minimamente processada	-722	5	10
(CASTAGNIN I et al., 2015)	Maçã	Suco de mirtilo com alto teor de antocianinas	Obter snack de maçã enriquecido com antocianinas	-722	10	10
(CASTELLÓ; FITO; CHIRALT, 2006)	Morango	Glicose (8 °Brix)	Aumentar a vida de prateleira de morango minimamente processado	-722	5	5
(CHINPRAHA ST et al., 2013)	Groselha	Sacarose (30, 40 e 50° Brix)	Obter groselha minimamente processada	- 709, -660 e -608	10	10
(CORRÊA et al., 2010)	Goiaba	Sacarose (40, 50 e 60 °Brix)	Pré-tratamento na obtenção de goiaba desidratada	-700	1 e 6	15, 30, 60, 120, 180 e 300

*Continuação da Tabela 2.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos*

<b>Referência</b>	<b>Matriz</b>	<b>Solução impregnada</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Pressão (mmHg)</b>	<b>Tempo impregnação (min)</b>	<b>Tempo de relaxamento (min)</b>
(CORRÊA; ERNESTO; DE MENDONÇA, 2016)	Tomate	NaCl (10%), sacarose (27,5%) e maltodextrina (27,5%) em combinações	Pré-tratamento na obtenção de tomate desidratado	-700	20	20, 30, 60, 90, 120, 180 e 240
(DEROSSI; DE PILLI; SEVERINI, 2010)	Pimentão	Ácido láctico (até atingir pH 2,7 da solução)	Obtenção de pimentão em conserva	-460 e -610	2 e 5	10, 15 e 30
(ERIHEMU et al., 2015)	Batata	Pirofosfato de ferro (0,4 g/100g)	Obtenção de batata enriquecida com ferro	-750	15, 30, 60 e 120	60, 120, 180 e 240
(HIRONAKA et al., 2011)	Batata	Ácido ascórbico (10%)	Enriquecer as batatas com ácido ascórbico	-690	60	180
(IGUAL et al., 2008)	Caqui	Sacarose (24 °Brix)	Prolongar a vida de prateleira de caqui processado	-722	5	5
(VASANTHA RUPASINGHE, 2010)	Maçã	Extrato de uva (15 °Brix)	Obter snack de maçã enriquecido com polifenóis	-560 e -660	5 e 15	15 e 30
(KANG; KANG, 2016)	Brócolis	Ácido málico (2%)	Introduzir agente antimicrobiano	-300 e -600	2,5, 5, 10 e 15	2,5; 5; 10 e 15
(MORENO et al., 2004)	Mamão	Sacarose (55 e 65%) (m/m)	Pré-tratamento na obtenção de mamão desidratado	Não informa	240	Não informa

Continuação da Tabela 2.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos

Referência	Matriz	Solução impregnada	Objetivo	Pressão (mmHg)	Tempo impregnação (min)	Tempo de relaxamento (min)
(MORENO et al., 2011)	Pera	Sacarose (65 °Brix)	Pré-tratamento na obtenção de pera desidratada	-722	5	255
(MORENO et al., 2012)	Morango	Sacarose (65 °Brix)	Pré-tratamento na obtenção de morango desidratado	-722	5	255
(MORENO et al., 2004)	Maçã	Suco de maçã com ácido fólico (200 mg/L)	Obter snak de maçã enriquecido com ácido fólico	-722	5	100
(MÚJICA-PAZ et al., 2003)	Maçã, melão e manga	Sacarose (41 a 60 °Brix)	Pré-tratamento na obtenção de frutas desidratadas	-255 e -670	10	10
(NERI et al., 2016)	Maçã	Sorbitol, glicose, sacarose, trealose e maltose (13 % m/m)	Prolongar a vida de prateleira de maçã minimamente processada	-118, -210, -300 e -722	0,16; 1,6 e 16,66	1
(PANARESE et al., 2014)	Espinafre	Sacarose e trealose (0,999 aw)	Prolongar a vida de prateleira de espinafre	-650	10	Não informa
(SANZANA; GRAS; VIDAL-BROTÓNS, 2011)	Endívia, couve-flor, brócolis e cenoura	Sacarose e aloe vera (5 e 30 g/L)	Prolongar a vida de prateleira	-722	10	10

*Continuação da Tabela 2.8- Trabalhos que utilizam impregnação a vácuo em alimentos*

<b>Referência</b>	<b>Matriz</b>	<b>Solução impregnada</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Pressão (mmHg)</b>	<b>Tempo impregnação (min)</b>	<b>Tempo de relaxamento (min)</b>
(SCHMIDT; CARCIOFI; LAURINDO, 2008)	Peito de frango	Salmoura	Aumentar a eficiência no processo de salga	-750	15	0
(SCHULZE et al., 2012)	Maçã	Glicose e quercetina (0,3 a 13 °Brix)	Obter maçã enriquecida	-160 a -700	5	10
(VARGAS et al., 2009)	Cenoura	Quitosana ( 1 e 2% (m/v))	Prolongar vida de prateleira	-722	4	2

Alguns trabalhos utilizaram o método de impregnação a vácuo em morangos para a obtenção de morangos desidratados (MORENO et al., 2012), com a finalidade de aumentar a vida de prateleira de morangos minimamente processados (CASTELLÓ; FITO; CHIRALT, 2006) e para melhorar a qualidade após congelamento e descongelamento (RENO; PRADO; RESENDE, 2011; VELICKOVA et al., 2013; XIE; ZHAO, 2004).

No estudo realizado por Reno, Prado e Resende (2011), os morangos em metades foram impregnados com soluções de glicose (20%) contendo pectina (1,5 e 3%) e/ou cloreto de cálcio (3 e 6%) sob diferentes pressões (-125, -380 e -630 mmHg) por 4 horas. Os autores avaliaram o efeito das diferentes concentrações das soluções e a pressão de vácuo sobre o teor de sólidos solúveis, textura, perda de massa após descongelamento e deformação das células dos frutos após congelamento e descongelamento.

Já Xie e Zhao (2004), além do objetivo de melhorar a qualidade dos frutos após congelamento e descongelamento, quiseram promover o enriquecimento dos morangos com cálcio e zinco. Para isso, impregnaram morangos em fatias com soluções de xarope de milho com alto teor de frutose (50%), pectina (3%), cálcio (0,04 %) e lactato de zinco (15 a 20%). No processo de impregnação, foi utilizada pressão de -710 mmHg por 15 min e tempo de relaxamento de 20 min. Os autores verificaram o teor de

---

umidade, teor de sólidos solúveis, acidez titulável, pH, cor, textura e perda de massa após descongelamento.

O efeito crioprotetor da trealose em morangos foi verificado somente por Velickova et al. (2013) que impregnaram soluções de trealose (0,2 e 12 g/100 g) e proteína anticongelamento (0,2 g/100 g) em morangos inteiros. Para tal submeteram as amostras à impregnação a -645 mmHg por 14 min. Para avaliar o efeitos dos crioprotetores nas amostras após congelamento e descongelamento, os autores verificaram a perda de massa após descongelamento, análise de textura e análise de microscopia.

Percebe-se a carência de estudos com a avaliação de diferentes condições de impregnação a vácuo em morangos mostrando as alterações que o processo causa nos frutos. Percebe-se também, que poucos estudos foram realizados com a utilização de crioprotetores em morangos, principalmente a trealose.

## Capítulo 4- Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados tanto nos testes preliminares como nos testes para verificação do poder crioprotetor da trealose. São descritos também os ensaios realizados em todas as etapas, bem como os procedimentos adotados em cada análise.

### 4.1 Matérias-primas

#### 4.1.1 Morangos

Foram utilizados morangos produzidos na região de Caxias do Sul para os teste preliminares e da região de Feliz para a segunda etapa de testes, ambas localizadas no estado do Rio Grande do Sul. Os frutos foram selecionados de acordo com a massa, tamanho e grau de maturação (determinado visualmente) para minimizar as diferenças na estrutura dos mesmos. De acordo com Antunes e Hoffmann (2012), o estágio de maturação para colheita do morango é quando pelo menos 75% da sua superfície possui coloração vermelha. Após colhidos, a coloração não varia por ser um fruto não-climatérico. Os morangos selecionados possuíam em média 95% da superfície vermelha, conforme mostra a Figura 4.1, que é uma fotografia de parte dos morangos utilizados. A massa dos morangos selecionados variou de 11 a 17 g, o comprimento, de  $40 \pm 5$  mm e a largura, de  $29 \pm 4$  mm.



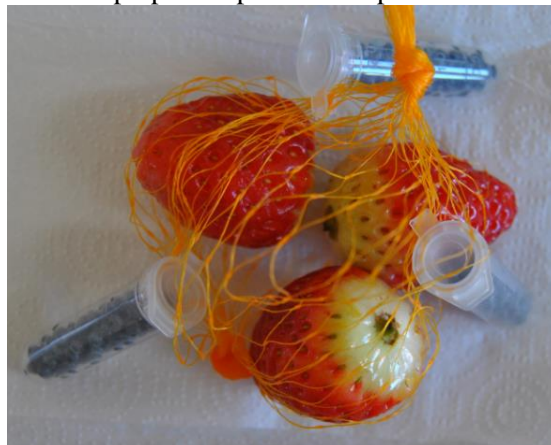
Figura 4.1- Amostra de morangos utilizada nos ensaios.



Fonte: autor.

Após seleção dos frutos, foi feita a remoção da sépala, seguida da higienização dos mesmos em água corrente. A seguir, os morangos foram imersos em solução de hipoclorito, a 200 ppm de cloro ativo, por 15 minutos e, então, foram lavados novamente em água corrente para remoção da solução de hipoclorito. Para a realização da impregnação de trealose, os morangos foram cortados em metades na seção longitudinal. Para garantir que a amostra ficasse totalmente imersa na solução a ser impregnada, as amostras foram acomodadas em redes e foram fixados tubos contendo chumbo. A Figura 4.2 mostra os morangos dentro da rede preparados para a imersão na solução.

Figura 4.2- Amostra preparada para ensaio preliminar de impregnação.



Fonte: Autor.

#### 4.1.2 Trealose

Para a preparação da solução de impregnação, foi utilizada trealose obtida a partir de amido produzida pela empresa japonesa Hayashibara. O lote utilizado foi o de número 37087, com fabricação em 26 de maio de 2015 e validade até 25 de maio de 2018. A matéria-prima apresentou pureza de 99,2 %, em base seca, conforme laudo do fornecedor. A pureza do açúcar foi confirmada com análise em HPLC, apresentando 97,58% de pureza em base úmida. Tanto o certificado de pureza do fornecedor como a análise em HPLC encontram-se no Apêndice A.

Para a realização dos testes, foram preparadas soluções de trealose e água destilada nas concentrações de 100 g/L, 200 g/L (utilizada somente nos testes preliminares), 300 g/L e 500 g/L. Os trabalhos que utilizam soluções de trealose trabalham com concentrações na faixa de 110 g/L ((DYMEK et al., 2015) e 400 g/L (PHOON et al., 2008). Considerando esta faixa apresentada na literatura e que a diluição da trealose em água, a 20 °C, é 68,9 g/100 g (HIGASHIYAMA, 2002), decidiu-se utilizar as concentrações de 100 a 500 g/L a fim de observar os efeitos de soluções pouco concentradas (100 g/L), com concentração mediana (300 g/L) e com alta concentração (500 g/L).

As soluções foram preparadas com auxílio de balança com precisão de 2 casas decimais (*Marte*, modelo A10K) para pesagem da trealose. O soluto foi diluído em um béquer e transferido quantitativamente para balão volumétrico onde o volume da solução foi ajustado.

##### 4.1.2.1 Determinação da Massa Específica das Soluções de Trealose

A massa específica,  $\rho$ , das soluções de trealose foi determinada a fim de caracterizar as soluções e auxiliar no estudo da incorporação da trealose nos morangos. Para tal, foi utilizado o método picnométrico, método n° 950.28 da AOAC (1997) que consiste em preencher com a amostra frascos com volume e massa conhecidos, chamados picnômetros.

Foram utilizados picnômetros de 25 mL calibrados com água destilada para a obtenção do valor do volume real dos mesmos. Para a calibração, os picnômetros foram lavados, secos em estufa (*Solab*, modelo SL 102/100) a 105 °C e a massa foi

determinada em balança com precisão de décimo de miligrama. Em seguida, foram preenchidos com água destilada para a determinação da massa e obtenção do volume real ( $V_{pic}$ ) através da Equação (4.1), em que  $\rho_w$  é a massa específica da água a 22 °C (temperatura na qual a massa específica foi determinada),  $m_{pic}$  é a massa do picnômetro e  $m_{picw}$  é a massa do picnômetro preenchida com água.

$$V_{pic} = \frac{m_{picw} - m_{pic}}{\rho_w} \quad (4.1)$$

Na determinação da massa específica das soluções, os picnômetros calibrados foram completamente preenchidos com a amostra e a massa específica foi determinada através da Equação (4.2), em que  $m_{picm}$  é a massa do picnômetro com a solução,  $m_{pic}$  é a massa do picnômetro e  $V_{pic}$  é o volume real do picnômetro. A determinação foi realizada em triplicada, na temperatura ambiente de 22 °C, para as soluções de 100 g/L, 300 g/L e 500 g/L.

$$\rho = \frac{m_{picm} - m_{pic}}{V_{pic}} \quad (4.2)$$

#### 4.1.2.2 Determinação da Viscosidade das Soluções de Trealose

Assim como a massa específica, a viscosidade das soluções de trealose foi determinada a fim de caracterizar as soluções e auxiliar no estudo da incorporação da trealose nos morangos. Para isso foi utilizado o viscosímetro de Ostwalt (*Schott*, modelo AVS 350) que mede o tempo que o líquido leva para escoar, devido à força da gravidade, em um tubo capilar n° 150, tipo 513 com diâmetro de 0,77 mm, imerso em banho termostático (*Schott*, modelo CT52) a 22 °C.

Primeiramente, foram realizados ensaios com água destilada para a calibração do sistema. Tanto a calibração como as medições com as soluções foram realizadas em triplicata, sendo o valor de cada replicata o valor médio de 5 passagens pelo capilar.

Com os tempos medidos pelo viscosímetro, obteve-se a viscosidade da solução através da Equação (4.3), em que  $\eta$  e  $\eta_w$  são as viscosidades cinemáticas (em m<sup>2</sup>/s) da solução e da água, respectivamente,  $\rho$  e  $\rho_w$  são a massa específica (em kg/m<sup>3</sup>) da solução

e da água, respectivamente, e  $t$  e  $t_w$  são os tempos (em s) observados para o escoamento da solução e da água no viscosímetro.

$$\frac{\eta}{\eta_w} = \frac{\rho \times t}{\rho_w \times t_w} \quad (4.3)$$

De acordo com Konini et al (1996), as soluções de açúcares apresentam comportamento Newtoniano, ou seja, a viscosidade é independente da taxa de deformação a que o fluido está submetido. Devido a isso, a viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) pode ser determinada através da Equação (4.4), sendo os valores da massa específica àqueles obtidos experimentalmente.

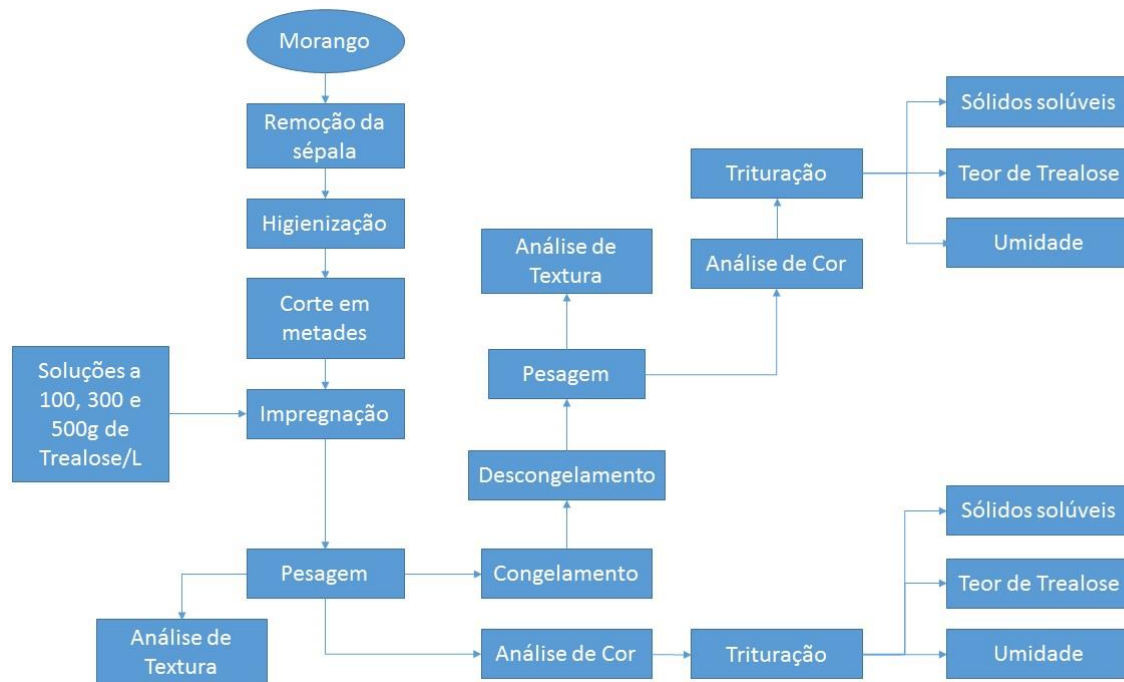
$$\mu = \eta \times \rho \quad (4.4)$$

## 4.2 Tratamentos

Primeiramente, foram realizados testes preliminares para identificação da melhor condição de impregnação em relação à pressão de vácuo, ao tempo de impregnação, ao tempo de relaxamento e ao tamanho da amostra.

Depois de identificada a melhor condição, seguiu-se o fluxograma ilustrado na Figura 4.3 para verificação da eficácia da trealose como crioprotetor.

Figura 4.3- Fluxograma do processo de verificação da eficácia da trealose como crioprotetor em morangos



Fonte: Autor

Os testes preliminares e as etapas do fluxograma são detalhados a seguir.

#### 4.2.1 Testes Preliminares

A seguir são descritos os testes preliminares realizados para identificação da melhor condição de impregnação.

##### 4.2.1.1 Primeiro planejamento fatorial: identificação dos fatores significativos

Baseando-se nas condições de impregnação a vácuo abordadas na literatura, já apresentados no capítulo anterior, variou-se a pressão de vácuo, o tempo de impregnação e o tempo de relaxamento a fim de identificar os fatores significativos e determinar a melhor condição experimental. Para isso, foi conduzido um planejamento composto central, que consiste num fatorial  $2^3$  incluindo três repetições no ponto central. As variáveis independentes - tempo de impregnação (x1), tempo de relaxamento (x2) e pressão de vácuo (x3) - foram avaliadas em três níveis. Para a realização dos

ensaios, impregnou-se solução de água destilada com 4% de corante azul de metileno para visualizar a “penetração” da solução.

Os níveis de pressão de vácuo, tempo de impregnação e tempo de relaxamento estão mostrados na Tabela 4.1. As respostas avaliadas foram o índice de impregnação, o teor de sólidos solúveis e a análise visual da área impregnada com corante azul de metileno.

Nos ensaios, foram utilizados três morangos inteiros que passaram pelos critérios de seleção, tiveram a sépala removida e foram higienizados com solução de hipoclorito a 200 ppm.

Tabela 4.1- Primeiro planejamento fatorial: identificação dos fatores significativos onde t1 é o tempo de impregnação, t2 é o tempo de relaxamento e P é a pressão.

Ensaio	x1	x2	x3	t1 (min)	t 2(min)	P (mm Hg)
1	-1	-1	-1	1	1	-250
2	+1	-1	-1	10	1	-250
3	-1	+1	-1	1	10	-250
4	+1	+1	-1	10	10	-250
5	-1	-1	+1	1	1	-650
6	+1	-1	+1	10	1	-650
7	-1	+1	+1	1	10	-650
8	+1	+1	+1	10	10	-650
9	0	0	0	5,5	5,5	-450
10	0	0	0	5,5	5,5	-450
11	0	0	0	5,5	5,5	-450

Fonte: Autor.

#### 4.2.1.2 Segundo planejamento fatorial: identificação da melhor condição de impregnação

A partir do primeiro planejamento fatorial, identificou-se como fatores significativos, o tempo de relaxamento (x2) e pressão de vácuo (x3), e realizou-se novo planejamento fatorial  $2^2$ , variando somente os mesmos a fim de identificar a melhor

condição de impregnação. O tempo de impregnação de 5 min foi mantido em todos os ensaios neste planejamento. Os níveis de pressão de vácuo e tempo de relaxamento são mostrados na Tabela 4.2. As respostas avaliadas foram as mesmas do primeiro planejamento fatorial: índice de impregnação, teor de sólidos solúveis e análise visual da área impregnada com corante azul de metileno.

Nos ensaios, também foram utilizados três morangos inteiros que passaram pelos critérios de seleção, tiveram a sépala removida e foram higienizados com solução de hipoclorito a 200 ppm. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Tabela 4.2- Segundo planejamento fatorial: identificação da melhor condição de impregnação.

Ensaio	x2	x3	t 2(min)	P (mm Hg)
1	-1	-1	5	-450
2	+1	-1	10	-450
3	-1	+1	5	-650
4	+1	+1	10	-650

Fonte: Autor.

#### 4.2.1.3 Teste da condição da amostra

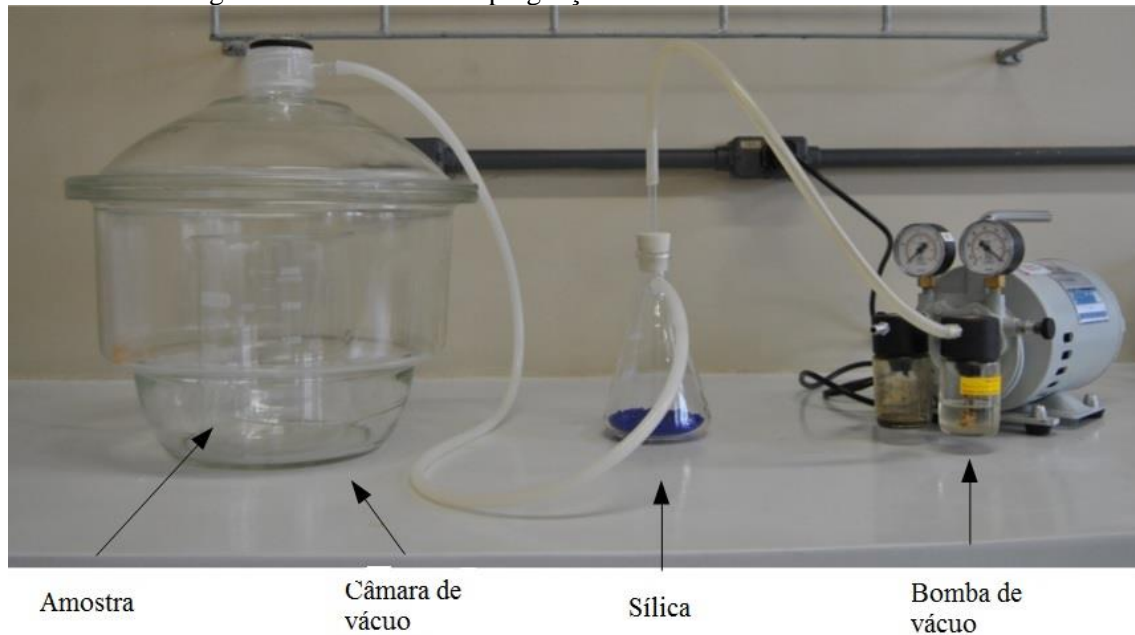
A fim de verificar a melhor condição da amostra, realizaram-se ensaios com morangos inteiros e morangos pela metade, cortados na seção longitudinal, utilizando como solução impregnante uma solução de trealose a 100 g/L.

A pressão de vácuo aplicada nos ensaios foi de -650 mmHg, o tempo de impregnação foi de 5 min e o tempo de relaxamento foi de 10 min, baseado nos resultados obtidos anteriormente. Para verificar qual condição de amostra continha maior quantidade de trealose impregnada, determinou-se, por HPLC, a quantidade de trealose em morangos *in natura*, cortados pela metade e inteiros. O processo de quantificação por HPLC está descrito na seção 4.3.4.

### 4.2.2 Impregnação a Vácuo

Para a realização dos ensaios de impregnação a vácuo foi montado o sistema cuja fotografia está apresentada na Figura 4.4.

Figura 4.4- Sistema de impregnação a vácuo utilizado nos ensaios.



Fonte: Autor.

A câmara de vácuo foi construída a partir de um dessecador. Este, por sua vez, foi conectado a um Kitasato contendo sílica gel para capturar possíveis gotículas sugadas pela bomba e impedir que estas entrassem na mesma. O Kitasato, foi conectado a uma bomba de vácuo (*Prismatec*, Modelo 131).

Nos ensaios de impregnação, imergiu-se a amostra na solução a ser impregnada acomodada em um béquer de modo que ela ficasse totalmente coberta pelo líquido. O béquer, contendo a solução e a amostra, foi posicionada no interior da câmara de vácuo. Para a aplicação do vácuo, a câmara foi fechada e as mangueiras conectadas. Após o período de aplicação de vácuo, desconectaram-se as mangueiras para o reestabelecimento da pressão atmosférica. Após o sistema atingir a pressão atmosférica, a tampa da câmara foi removida e a amostra permaneceu imersa no líquido durante o tempo de relaxamento.

Os ensaios para verificação da eficácia da trealose como crioprotetor foram realizados com morangos cortados em metades, na seção longitudinal, selecionados e higienizados conforme descrito na seção 4.1.1. Os testes de impregnação foram



conduzidos à pressão de vácuo de -650 mmHg, com tempo de impregnação de 5 min e tempo de relaxamento de 10 min. Variou-se a concentração da solução de trealose de 100 g/L a 500 g/L conforme a Tabela 4.3. Cada teste foi realizado com seis replicatas devido à variação natural dos morangos em relação ao seu grau de maturação que pode influenciar os resultados.

Tabela 4.3- Esquema de ensaios de impregnação a vácuo com soluções de trealose.

Ensaio	Concentração da solução de tratamento
1	100 g/L
2	300 g/L
3	500 g/L

Fonte: Autor.

A relação fruta:solução utilizada foi de 1:4. Visto que a força motriz da impregnação a vácuo é a diferença de pressão e não a diferença de concentração entre a solução e a amostra, a relação fruta:solução não precisa garantir a manutenção da concentração da solução (XIE; ZHAO, 2004). Além disso, essa proporção garantiria a que todos os morangos ficassem totalmente imersos na solução.

As amostras impregnadas foram sempre comparadas com uma amostra controle, que é a amostra sem tratamento, que não sofreu impregnação.

#### 4.2.2.1 Determinação do Índice de Incorporação

O índice de impregnação ou índice de incorporação (IC) representa o quanto a massa da amostra variou após passar pelo processo de impregnação. Sabe-se que durante o processo de impregnação a vácuo pode ser externado da amostra, junto com as bolhas de ar, líquidos ou outras porções da matriz devido à sucção do vácuo. O índice de impregnação, porém, quantifica somente o resultado das transferências de massa e não as porções de massa que entraram e que saíram. Devido a este fato, não se pode comparar o índice de impregnação de matrizes ou de soluções diferentes, visto que as matrizes podem perder mais ou menos massa e a massa específica da solução também influencia na quantificação.

Desse modo, o índice de impregnação é um parâmetro utilizado para quantificar a variação percentual de massa que a amostra sofreu devido ao processo de impregnação, podendo-se dizer que somente amostras iguais, com soluções iguais, sofreram mais ou menos impregnação de acordo com o índice e sendo que, quanto maior o índice, maior a impregnação.

O índice de impregnação é definido de acordo com a Equação (4.5) em que  $m_{in}$  é a massa da amostra antes da impregnação (*in natura*) e  $m_f$  é a massa da amostra após impregnação.

$$IC(\%) = \frac{m_f - m_{in}}{m_{in}} \times 100 \quad (4.5)$$

Para a determinação do índice, as amostras selecionadas, higienizadas e secas foram pesadas antes e logo após a impregnação com o auxílio de balança com precisão de décimo de miligrama (*Shimadzu*, Modelo AY220). Após o período de relaxamento, as amostras foram deixadas em repouso por 2 min em peneira inclinada, conforme sugerido pelo método 953.15 da AOAC (1997), para determinação de peso drenado e tiveram a superfície seca com papel absorvente, a fim de retirar o excesso de solução acumulada na superfície da amostra. Somente após a retirada do excesso de solução que as amostras foram conduzidas à determinação da massa  $m_f$ . Foi determinado o índice de impregnação de cada uma das seis replicatas.

#### 4.2.3 Congelamento

Após a etapa de impregnação dos morangos com as soluções de 100, 300 e 500 g/L de trealose, as amostras foram depositadas em sacos de polietileno devidamente fechados e congeladas em freezer vertical a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*Consul*, modelo CVU 18/ 127). O freezer vertical é considerado um método de congelamento lento de acordo com Hung e Ericksin (1997).

Para a avaliação do efeito crioprotetor da trealose, é necessário que o método de congelamento seja lento, a fim de formar cristais de gelo grandes e de induzir a desidratação das células. O efeito do crioprotetor é observado ao minimizar estes efeitos. De acordo com Ordóñez et al. (2005), os crioprotetores possuem efeito

pronunciado somente quando o congelamento é realizado de forma lenta. Produtos em que o congelamento é realizado de forma rápida, os crioprotetores podem ter efeito contrário, pois podem atuar como núcleos para a formação de gelo.

#### 4.2.4 Descongelamento

O descongelamento foi realizado de acordo com o método para determinação de peso líquido de frutas congeladas (método número 974.12 da AOAC, (1997)). O método consiste em manter as amostras depositadas em sacos de polietileno lacrados, imersos em banho termostático (*Lauda*, modelo RA12) a  $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  até que a amostra atinja  $20\text{ °C}$  no seu centro geométrico. Para a aplicação do método, testes de tempos de imersão foram realizados até que fosse determinado o período de 40 min de imersão da amostra no banho como o período mínimo necessário para que a amostra atingisse  $20\text{ °C}$  no seu centro geométrico.

O método é indicado por utilizar temperaturas baixas, por ser um método rápido e por impedir a oxidação do morango que ocorre na presença do oxigênio (INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO, 1990).

### 4.3 Avaliação do Poder Crioprotetor da Trealose em Morangos

#### 4.3.1 Variação de Massa após Descongelamento (Perda por Gotejamento)

A variação de massa após o descongelamento é uma das medidas mais importantes na verificação da ação de um crioprotetor. A água que o alimento perde durante o descongelamento, provoca grandes alterações no produto como mudanças na textura, no sabor e na sua coloração. Quanto maior a perda de água, menor a efetividade do crioprotetor que é adicionado com a intenção de reter a água presente no alimento, seja ela intracelular ou extracelular. Para a quantificação de tal parâmetro, utilizou-se a Equação (4.6) que relaciona a massa da amostra *in natura* ( $m_i$ ) e a massa da amostra descongelada ( $m_d$ ).

$$\Delta md (\%) = \frac{m_d - m_{in}}{m_{in}} \times 100 \quad (4.6)$$

Foi realizado o descongelamento, conforme descrito na seção 4.2.4. Deixou-se as amostras em repouso por 2 min em peneira inclinada conforme sugerido pelo método 953.15 da AOAC (1997) para determinação de peso drenado de frutas congeladas e secou-se a superfície com papel absorvente a fim de retirar o excesso de água no exterior do produto. Após, a massa da amostra descongelada ( $m_d$ ) foi determinada. A massa em ambos os momentos foi determinada em balança com precisão de décimo de miligrama (*Shimadzu*, Modelo AY220).

#### 4.3.2 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis

O teor de sólidos solúveis foi determinado nas amostras *in natura* (sem tratamento), após a impregnação e após o descongelamento das mesmas, a fim de verificar as alterações provocadas pela impregnação a vácuo com as diferentes concentrações de solução de trealose, a fim de verificar a perda de sólidos solúveis das amostras tratadas com as diferentes soluções após o descongelamento das mesmas. Para a determinação, seguiu-se o método n° 932.12 da AOAC (1997).

Para isso, as amostras foram, primeiramente, trituradas com o auxílio de um mixer (*Philips Walita*, modelo RI 1364) para redução da amostra. Os morangos triturados foram então centrifugados em centrífuga refrigerada (*Sigma*, modelo 2-16KL), por 40 min, a 20 °C, a fim de separar os sólidos insolúveis que podem provocar alterações na leitura do refratômetro. Foi utilizado o refratômetro (*Carl Zeiss*, modelo 32-G) para leitura direta do teor de sólidos solúveis em °Brix do sobrenadante das amostras.

A leitura foi realizada em triplicata em cada uma das seis replicatas do ensaio.

#### 4.3.3 Determinação do Teor de Umidade e Substâncias Voláteis

O teor de umidade das amostras *in natura*, após impregnação e após descongelamento, foi determinado através do método gravimétrico 930.04 da AOAC

(1997). O teor de umidade é parâmetro importante para indicar a ocorrência de desidratação das amostras após o descongelamento.

Cápsulas metálicas foram secas em estufa a 105 °C (*Solab*, modelo SL 102/100) com aproximadamente 5 g de areia e bastão de vidro para a determinação da tara das mesmas. Devido ao alto teor de açúcar das amostras, faz-se necessária a utilização de areia tratada durante a secagem para evitar a caramelização e a formação de uma crosta superficial que impede a evaporação da água da amostra. O bastão de vidro foi utilizado para homogeneização da amostra com a areia.

Após a determinação da massa do sistema cápsula+areia+bastão de vidro, aproximadamente 5 g de morangos, previamente triturados com o auxílio de um mixer (*Philips Walita*, modelo RI 1364), foram homogeneizados à areia e secos em estufa a 105 °C por 24 h. Após resfriamento realizado em dessecador, as cápsulas contendo a amostra foram pesadas em balança com precisão de décimo de miligrama (*Shimadzu*, Modelo AY220) e levadas novamente à estufa para secagem. O procedimento de secagem, resfriamento e pesagem foi realizado até que a massa do sistema apresentasse variação menor que 0,002 g (peso constante).

O teor de umidade ( $x_w$ ) foi determinado por diferença, através da Equação (4.7) em que  $m_s$  é a massa do sistema após secagem,  $m_c$  é a massa da cápsula com areia tarada e  $m_a$  é a massa da amostra. A análise foi realizada em triplicata para cada uma das seis repetições de cada tratamento.

$$x_w = \frac{m_s - m_c}{m_a} \quad (4.7)$$

#### 4.3.4 Determinação do Teor de Trealose

O teor de trealose foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*- HPLC) (*Agilent*, modelo 1260 Infinity), conforme método indicado pelo fabricante de colunas REZEX<sup>TM</sup>. A coluna utilizada da marca Rezex foi a RHM Monossacaride com índice de refração e vazão da fase móvel de 0,6 mL/min de água Mili-Q e temperatura de 80 °C. O tempo de retenção da trealose foi de 8,9 min. Para a quantificação da trealose, foi feita uma curva de calibração,

utilizando a trealose como padrão com sete soluções com concentração de  $1 \times 10^{-5}$  até 10 g/L.

As amostras foram trituradas com o auxílio de um mixer (*Philips Walita*, modelo RI 1364) e aproximadamente 5 g foram diluídas até 50 mL. Foi retirada uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e diluído em 10 mL de água. As amostras foram filtradas em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro nominal (*Durapore*, hidrofílica) e armazenadas em *vials* para injeção no HPLC.

Foram realizadas duas injeções com cada uma das seis repetições de cada tratamento.

#### 4.3.5 Análise Colorimétrica

As alterações de cor nas frutas congeladas se dão devido à oxidação e à mudança de pH que modificam a coloração das antocianinas (FELLOWS, 2007). Para verificar o efeito da impregnação sobre a coloração dos morangos, bem como do descongelamento, foram realizadas análises de cor nos frutos *in natura*, após impregnação e após descongelamento. Para tal, utilizou-se o colorímetro (*Hunterlab*, modelo Color QUEST XE) calibrado para a cor branca. A escala colorimétrica de leitura empregada foi a do sistema de coordenadas cromáticas com base no espaço de cor CIELAB  $L^* a^* b^*$ , sendo  $L^*$  a medição de luminosidade que varia do branco (100) ao preto (0),  $a^*$  a medição de tonalidade do verde ( $-a^*$ ) ao vermelho ( $+a^*$ ) e o  $b^*$  a medição da tonalidade azul ( $-b^*$ ) ao amarelo ( $+b^*$ ). A partir destes parâmetros, foram calculados os valores de *Croma* e *Hue*, apresentados nas Equações (4.8)(4.9 sendo que *Croma* se refere à saturação e *Hue* representa o ângulo do tom.

$$Croma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (4.8)$$

$$^{\circ}Hue = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (4.9)$$

Foram feitas medições na parte interna e externa dos morangos cortados em metades. Em cada um dos lados foi feita a medição em dois pontos, sendo cada um mais

próximo de cada extremidade. Assim, totalizaram-se quatro medições (duas de cada lado) em cada uma das três metades de cada uma das três repetições de cada tratamento. Como a coloração da parte interna difere da parte externa, separaram-se os resultados dos pontos medidos na parte interna, dos pontos medidos na parte externa.

#### 4.3.6 Análise de Textura

A análise de textura através do teste de compressão mede a resistência do material à compressão, ou seja, determina a força necessária para provocar determinada deformação. Quanto mais rijo o material, mais resistente à compressão e maior é a força necessária (POTTER; HOTCHKISS, 1999). Verificou-se assim, a força necessária para a compressão das metades dos morangos até deformação de 5% da sua altura (95% de compressão) utilizando *probe* de 50 mm de diâmetro conectada ao texturômetro (*Stable Micro Systems*, modelo TA.XT plus). Os testes foram realizados com velocidade de 2 mm/s baseados na metodologia utilizada por Xie e Zhao (2004).

A análise foi realizada após impregnação e após descongelamento com quatro metades de cada uma das cinco repetições de cada tratamento em cada situação (após impregnação e após descongelamento). Foi realizada análise também na amostra controle que é o morango sem tratamento *in natura* e após congelamento e descongelamento.

#### 4.3.7 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Para tal, utilizou-se o *Software Statistica 12.0*.

## Capítulo 5- Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta os resultados obtidos a partir do estudo da impregnação a vácuo em morangos, avaliando os frutos impregnados com diferentes soluções de trealose, a impregnação com diferentes pressões, tempos de impregnação, tempos de relaxamento e condições da matéria-prima. São apresentados os resultados da avaliação da trealose como crioprotetor em morangos em relação ao teor de umidade, ao teor de sólidos solúveis, à textura, à cor, e à perda de líquido após descongelamento.

O capítulo foi dividido em três seções. Inicialmente, é apresentada a caracterização das soluções de trealose em relação à massa específica e à viscosidade. Na segunda seção, são apresentados os resultados dos testes de avaliação das condições de impregnação e as alterações provocadas pela impregnação a vácuo na amostra. Por último, são apresentados os resultados da ação da trealose como crioprotetor.

### 5.1 Propriedades das Soluções de Trealose

#### 5.1.1 Massa Específica

Os valores da massa específica das soluções de trealose obtidos experimentalmente são apresentados na Tabela 5.1. A concentração da solução foi fator significativo no valor da massa específica, sendo que quanto mais concentrada a solução maior a massa específica das soluções. Levando em consideração que a massa específica da trealose é 1,58 g/mL a 24 °C (NIST, 2016) e da água é 0,9966 g/mL (HOLMAN, 1986), é esperado que, quanto maior a fração de trealose maior a massa específica da solução. De acordo com Michailidis, Krokida e Rahman (2009) a Equação (5.1) pode ser utilizada para estimar a massa específica de produtos alimentícios sendo  $X_i$  e  $\rho_i$  a fração mássica e a massa específica de cada componente respectivamente. A partir da Equação (5.1), obteve-se os valores teóricos para as soluções a 24 °C que também são apresentados na Tabela 5.1.



$$\frac{1}{\rho} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{\rho_i} \quad (5.1)$$

Tabela 5.1 - Valores da massa específica das soluções de trealose a 22 °C, obtidas experimentalmente e calculadas teoricamente a 24 °C (MICHAILIDIS, P. A., KROKIDA, M. K., RAHMAN, 2009).

Concentração da Solução (g/L)	Massa Específica Experimental a 22 °C (g/mL) (**)	Massa Específica Teórica a 24 °C (g/mL)
100	1,032 ± 0,002 <sup>c</sup>	1,0336
300	1,106 ± 0,002 <sup>b</sup>	1,1075
500	1,182 ± 0,001 <sup>a</sup>	1,1810

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

\*\* Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n=3).

Os valores teóricos foram calculados para a temperatura de 24 °C devido à disponibilidade de dados na literatura. A diferença entre os valores experimentais e teóricos foi menor do que 0,2%, indicando uma boa comparação entre eles.

### 5.1.2 Viscosidade Dinâmica

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores da viscosidade dinâmica das soluções de trealose utilizadas nos ensaios de impregnação a vácuo.

Tabela 5.2- Viscosidade dinâmica das soluções de trealose a 22 °C.

Concentração da Solução (g trealose/L)	Viscosidade a 22 °C (mPa.s) (**)
100	1,30 ± 0,01 <sup>c</sup>
300	3,01 ± 0,03 <sup>b</sup>
500	8,31 ± 0,08 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

\*\* Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n=3).

Percebe-se que o efeito da concentração da solução é fator significativo sendo que quanto mais concentrada a solução mais viscosa ela se torna. Os valores encontrados aproximam-se dos valores apresentados por Richards e Dexter (2001), citados por Mitchell (2012). De acordo com os autores, uma solução de trealose a 10%

(m/m), a 25 °C tem viscosidade de 1,1 mPa.s enquanto que a solução a 30% (m/m), a 25 C, tem viscosidade de 2,95 mPa.s.

## 5.2 Resultados da Impregnação a Vácuo em Morangos

### 5.2.1 Testes Preliminares

#### 5.2.1.1 Primeiro Planejamento Fatorial: identificação dos fatores significativos

Na Tabela 5.3 são apresentados os valores do índice de incorporação e de teor de sólidos solúveis para as condições estudadas. Percebe-se que o aumento da pressão de vácuo provoca aumento no índice de incorporação. O teor de sólidos solúveis sofreu diminuição com o aumento da pressão e do tempo de relaxamento. Visto que neste planejamento foi incorporada água, a diminuição do teor de sólidos solúveis significa maior quantidade de água impregnada na amostra.

Tabela 5.3- Índice de incorporação e teor de sólidos solúveis das amostras tratadas conforme primeiro planejamento fatorial.

Ensaio	t1 (min)	t2 (min)	P (mmHg)	Índice de Incorporação (%)	Teor de Sólidos Solúveis (°Brix) (**)
1	1	1	-250	1,80	8,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
2	10	1	-250	3,81	9,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
3	1	10	-250	6,65	8,6 ± 0,0 <sup>a</sup>
4	10	10	-250	5,13	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
5	1	1	-650	16,07	8,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
6	10	1	-650	17,16	8,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
7	1	10	-650	25,83	7,1 ± 0,1 <sup>c</sup>
8	10	10	-650	25,41	7,5 ± 0,4 <sup>c</sup>
9	5	5	-450	16,59	8,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
10	5	5	-450	19,15	8,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
11	5	5	-450	14,75	8,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
12	Controle				9,3 ± 0,1 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

\*\* Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n=3).

Na Tabela 5.4 são apresentados os efeitos dos fatores tempo de impregnação (t1), tempo de relaxamento (t2) e pressão (P), sobre o índice de incorporação e sobre o teor de sólidos solúveis das amostras de morango. Como pode ser observado nessa tabela, a pressão de vácuo foi fator significativo sobre o índice de incorporação e sobre o teor de sólidos solúveis. Além da pressão, o tempo de relaxamento, e a interação de ambos foram fatores significativos sobre o teor de sólidos solúveis.

Tabela 5.4- Valores de p sobre o índice de incorporação e sobre o teor de sólidos solúveis, em que t1 é o tempo de impregnação, t2 é o tempo de relaxamento e P é a pressão.

Fatores	Valor de p em relação a:	
	Índice de incorporação	Teor de sólidos solúveis
t1	0,209903	0,115785
t2	0,060779	0,000022 (+)
P	0,008573 (+)	0,000000 (+)
t1*t2	0,504364	0,415428
t1*P	0,980748	0,783577
t2*P	0,198913	0,025427 (+)
t1*t2*P	0,776557	0,184326

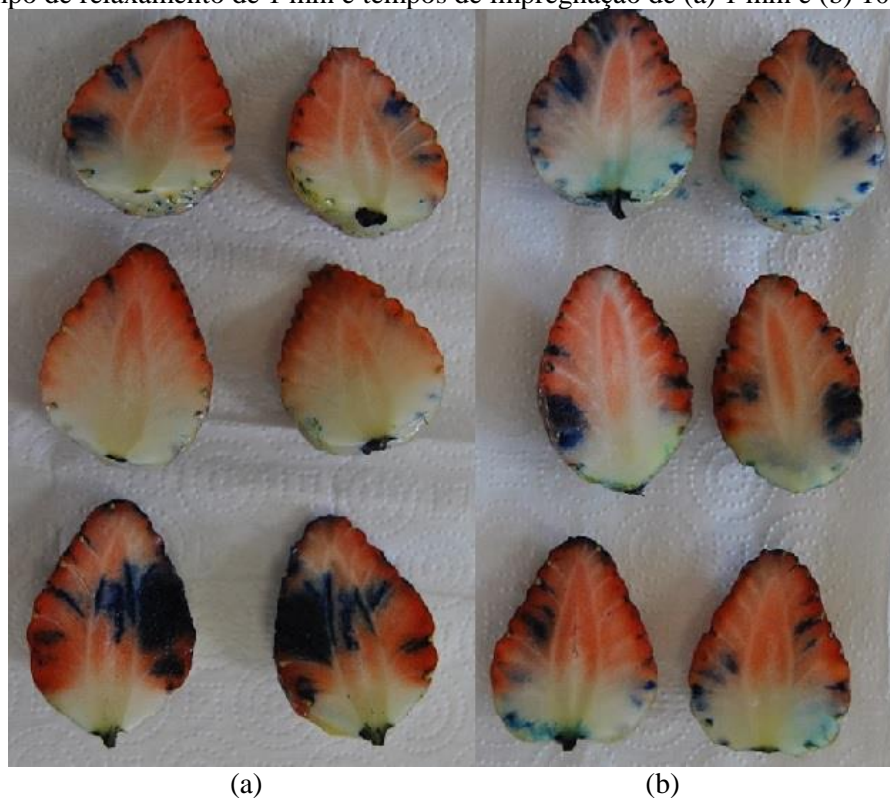
(+) significativo ( $p < 0,05$ ).

Durante o tempo de aplicação de vácuo, ocorre a expansão e expulsão das bolhas de ar que ficam alojadas nos espaços porosos do alimento (ZHAO; XIE, 2004). Experimentalmente, foi possível observar a migração das bolhas de ar do interior do alimento através do líquido durante o tempo de aplicação de vácuo. Percebeu-se que, após certo período de tempo, a quantidade de bolhas que saíam da matriz foi diminuindo, até cessar. Isso indica que o tempo de vácuo necessário deve ser suficiente para que todos os gases presentes no interior do alimento migrem para fora. Após esse período, a aplicação de vácuo não é mais necessária e não influenciará positivamente nos parâmetros avaliados. No planejamento realizado, o menor tempo (1 min) já foi suficiente para expulsar todas as bolhas, visto que não houve diferença significativa no índice de incorporação e no teor de sólidos solúveis com o aumento do tempo de vácuo para 5 e 10 min.

Neste planejamento, os morangos inteiros sofreram o tratamento de impregnação com solução contendo corante azul de metileno e foram cortadas ao meio para

visualização dos fenômenos hidrodinâmicos no interior da amostra. Ambos os tratamentos das fotografias da Figura 5.1 foram realizados com pressão de -250 mmHg, 1 min de tempo de relaxamento e tempos de aplicação de vácuo de 1 e 10 min respectivamente. As duas amostras ficaram praticamente iguais visualmente, mostrando que a variação no tempo de impregnação não exerceu diferença expressiva nas amostras. Em função deste resultado, escolheu-se trabalhar com o tempo de impregnação de 5 min por ser um tempo mais confortável para se trabalhar, possibilitando melhor controle dos experimentos, minimizando assim, pequenas diferenças experimentais.

Figura 5.1- Amostras impregnadas com solução de azul de metileno sob vácuo de -250 mmHg, tempo de relaxamento de 1 min e tempos de impregnação de (a) 1 min e (b) 10 min.

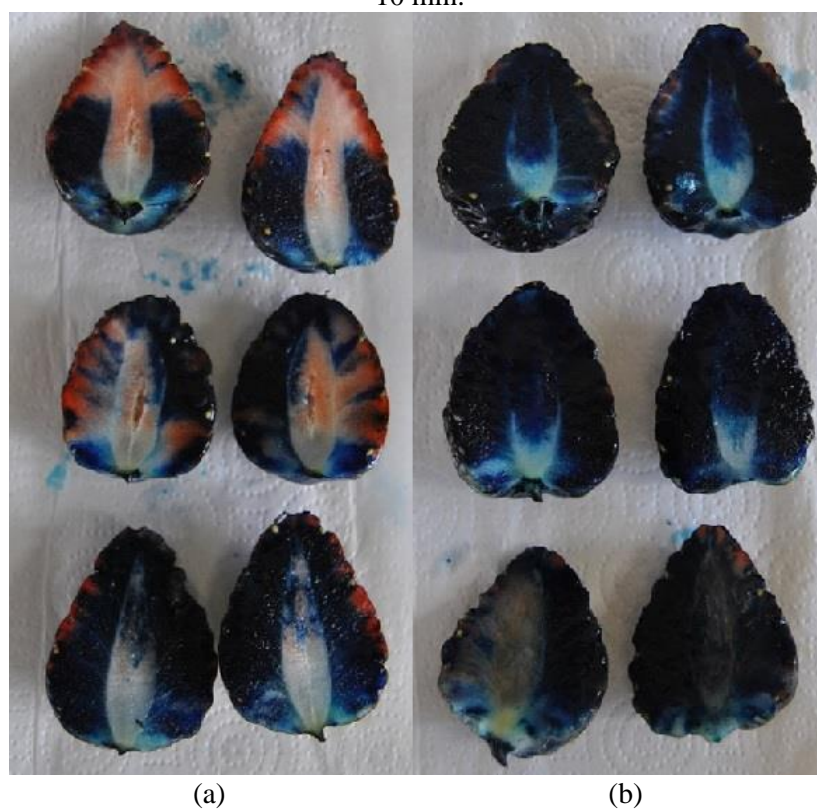


Fonte: Autor.

No período de relaxamento ( $t_2$ ) ocorre a difusão do líquido no qual o alimento está imerso para o interior do dele, ocupando os espaços porosos antes ocupados pelos gases. Observa-se na Tabela 5.3 que o valor do índice de impregnação e dos sólidos solúveis tende a aumentar com o aumento de  $t_2$ . O mesmo resultado é percebido na Figura 5.2 que apresenta as fotografias dos morangos impregnados com corante nos tratamentos 5 e 7. Ambas as amostras foram submetidas à pressão de -650 mmHg por

1 min e tempo de relaxamento de 1 e 10 min, respectivamente. A difusão do líquido nos morangos que ficaram imersos por mais tempo sob pressão atmosférica após o período de aplicação de vácuo é maior. Optou-se por investigar melhor, no segundo planejamento fatorial, o tempo de relaxamento, visto que as amostras tratadas com 5 min de tempo de relaxamento apresentaram resultados semelhantes às tratadas com 10 min de relaxamento (ensaios 7 e 8).

Figura 5.2- Amostras impregnadas com solução de azul de metileno sob pressão de -650 mmHg, tempo de impregnação de 1 min e tempos de relaxamento de (a) 1 min e (b) 10 min.



Fonte: Autor.

Paes (2005) realizou um estudo para verificar a influência do tempo aplicação de vácuo e de relaxamento em maçãs submetidas à impregnação a vácuo com soluções a 30 °Brix de sacarose. O autor verificou a variação de sólidos solúveis das amostras submetidas à pressão de -710 mmHg, com tempos de impregnação e de relaxamento que variaram entre 2 e 120 min. Os resultados mostraram que o tempo de impregnação aumentou expressivamente o valor de sólidos solúveis até o tempo de aproximadamente 25 min. Para períodos maiores que este, nenhuma influência significativa foi observada. Para o tempo de relaxamento, o autor observou influência significativa no valor de

sólidos solúveis nos primeiros 5 min. Após esse período, não observou influência significativa nos resultados devido ao mecanismo hidrodinâmico. Nos tratamentos com tempo de aplicação de vácuo maior que 60 min, ocorreu degradação da amostra enquanto que em períodos de relaxamento maiores que 60 min, ocorreu desidratação osmótica.

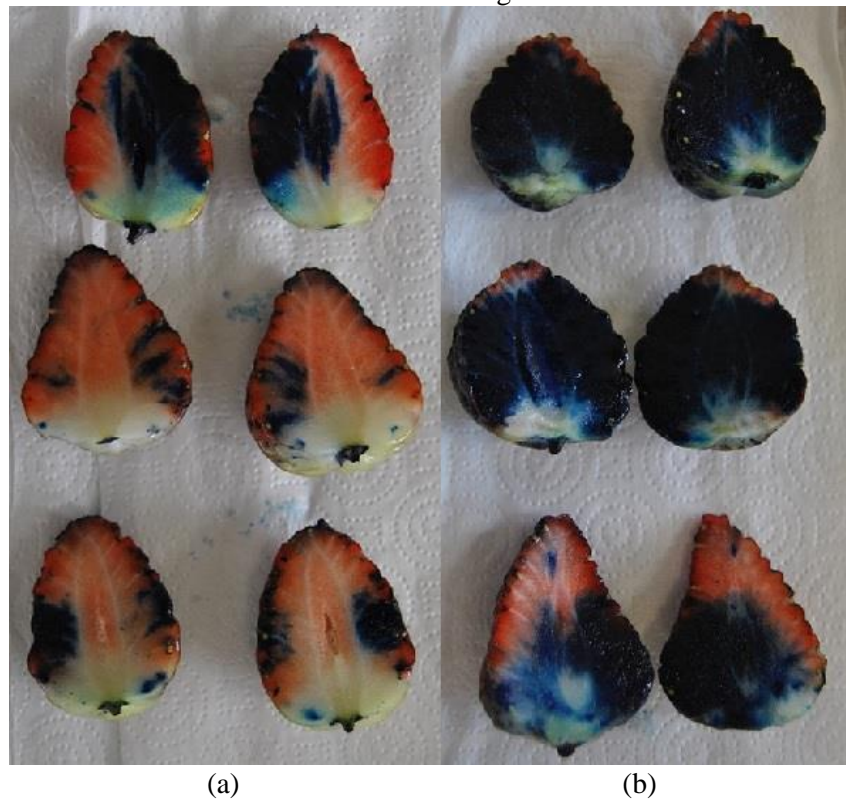
Erihemu et. al. (2015) estudaram o efeito do tempo de aplicação de vácuo e de relaxamento no enriquecimento de batatas inteiras com ferro através de impregnação a vácuo. Os autores variaram o tempo de aplicação de vácuo de 15 a 120 min e de relaxamento de 60 a 240 min. O tempo de aplicação de vácuo teve efeito significativo até 30 ou 60 min, dependendo do cultivar. Após isso, o aumento do tempo não aumentou a quantidade de ferro impregnado. Em relação ao tempo de relaxamento, o comportamento foi semelhante, quanto mais tempo a amostra ficou imersa na solução maior foi a quantidade de ferro impregnada até o tempo de 3 horas; após este período, o aumento do tempo não teve efeito significativo.

Além disso, é possível observar que os valores do índice de incorporação tendem a aumentar com o aumento da pressão de vácuo. Este resultado é esperado, visto que a diferença de pressão é a força motriz para que ocorra a transferência de massa durante o tratamento. Quanto maior a diferença mais a transferência de massa é impulsionada (FITO; PASTOR, 1994). Em relação ao teor de sólidos solúveis, percebe-se que os valores tendem a diminuir com o aumento da pressão de vácuo. Nos ensaios do primeiro planejamento, foi incorporada água com corante, com valor de sólidos solúveis desprezível. O esperado é que quanto mais água seja impregnada, mais os sólidos solúveis se diluam fazendo com que o teor diminua. Percebe-se que, quanto maior a pressão de vácuo maior a força motriz, maior a transferência de massa, maior o índice de impregnação e menor o teor de sólidos solúveis. Assim, os resultados do índice de incorporação e do teor de sólidos solúveis estão concordantes entre si.

A Figura 5.3 apresenta as fotografias dos morangos impregnados com solução de azul de metileno com tempos de impregnação e de relaxamento de 10 min cada e sob pressão de -250 e -650 mmHg. Observa-se que a amostra tratada com maior pressão de vácuo apresenta maior área impregnada com corante, inclusive em regiões mais próximas do centro da amostra. Optou-se por investigar melhor, no segundo planejamento fatorial, a pressão de vácuo, visto que amostras tratadas com pressões a

-450 mmHg apresentaram índices semelhantes às amostras tratadas com pressões de -650 mmHg.

Figura 5.3- Amostras impregnadas com solução de azul de metileno com tempos de impregnação e de relaxamento de 10 min cada e sob pressão de vácuo de (a) -250 e (b) - 650 mm Hg.



Fonte: Autor.

O efeito da pressão foi estudado por Marcussi (2005) que realizou ensaios de impregnação de solução de corante azul de metileno sob pressão atmosférica e sob pressão de vácuo (-740 mmHg) em peras. Nos ensaios realizados sob pressão atmosférica, as amostras ficaram imersas na solução por 90 min e não se visualizou a difusão da solução de corante no interior das amostras. Nos ensaios de impregnação a vácuo por 5 min, por sua vez, verificou-se a presença de solução de corante no interior da amostra mostrando a influência da pressão de vácuo na impregnação.

Cruz, Vieira e Silva (2009) impregnaram folhas de agrião com água em diferentes pressões de vácuo para avaliar qual pressão garantiria a impregnação de forma uniforme em toda a folha. Os autores realizaram os ensaios com pressões que variaram de -382 a -760 mmHg com tempos de aplicação de vácuo e de relaxamento de 5 min cada. O índice de incorporação aumentou significativamente com o aumento da

pressão de vácuo para toda a faixa de pressão estudada. O mesmo efeito da pressão em relação ao índice de impregnação foi verificado por Mújica- Paz et al. (2003) que avaliou pressões de -255 a -670 mmHg na impregnação de sacarose em maçã, melão e manga.

### 5.2.1.2 Segundo Planejamento Fatorial: identificação da melhor condição de impregnação

Na Tabela 5.5, são apresentados os resultados de índice de incorporação e de teor de sólidos solúveis das amostras de morango submetidas à impregnação a vácuo em solução de água com corante azul de metileno em diferentes condições de pressão (P) e de tempo de relaxamento (t2). Assim como no primeiro planejamento, a pressão de vácuo influenciou significativamente o índice de impregnação das amostras, sendo que, quanto maior o vácuo aplicado maior o índice. Em relação aos sólidos solúveis, a pressão não teve efeito significativo entre as amostras dos diferentes tratamentos, ocorrendo somente diferença significativa entre as amostras impregnadas e a amostra controle.

Tabela 5.5- Índice de incorporação e teor de sólidos solúveis das amostras submetidas aos tratamentos do segundo planejamento fatorial.

Ensaio	t2 (min)	P (mmHg)	Índice de Incorporação(%) (**)	Teor de Sólidos Solúveis (°Brix) (**)
1	5	-450	20 ± 1 <sup>b</sup>	7,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
2	10	-450	18 ± 1 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
3	5	-650	23 ± 3 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
4	10	-650	27 ± 3 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,4 <sup>b</sup>
5	Controle		0 <sup>c</sup>	11,3 ± 0,1 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de confiança pelo Teste de Tukey.

\*\* Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n=2)

Esperava-se, assim como no primeiro planejamento, que quanto maior o índice de impregnação, menor o teor de sólidos solúveis da amostra, visto que a impregnação neste planejamento também ocorreu com água. Através dos resultados, observa-se que não há diferença significativa entre o teor de sólidos solúveis das amostras tratadas. O



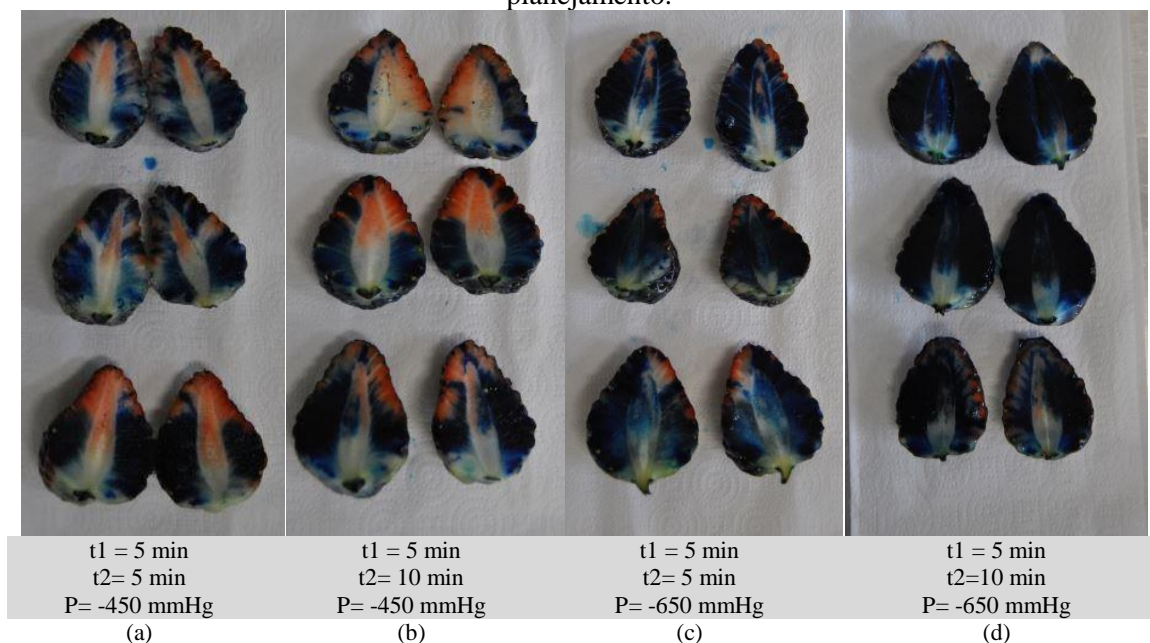
fato da pressão aplicada não exercer influencia significativa no teor de sólidos solúveis das amostras impregnadas pode ser explicado por se tratar de uma matriz muito úmida, com mais de 90% de umidade (MISRAN, 2013) e assim, as alterações no teor de umidade não são significativas.

Durante o tempo de relaxamento ocorre a penetração da solução para o interior da matriz e a difusão do fluido dentro dela. A Figura 5.4 apresenta as fotografias dos morangos tratados com as diferentes condições de tratamento, onde (a) são as com tempo de relaxamento de 5 min e pressão de -450 mmHg, (b) as amostras com tempo de relaxamento de 10 min e pressão de -450 mmHg, (c) as amostras com tempo de relaxamento de 5 min e pressão de -650 mmHg e (d) as amostras com tempo de relaxamento de 10 min e pressão de -650 mmHg. Percebe-se, nesta figura, que o tempo de relaxamento favorece a uniformidade da impregnação da solução com corante no interior da amostra. Porém fica visualmente claro que a pressão tem maior influência, provocando difusão mais uniforme e maior penetração da solução na matriz.

A combinação de maior vácuo (-650 mm Hg) e maior tempo de relaxamento (10 min) apresentou a melhor condição de impregnação nos morangos. Esta condição, aplicada no ensaio número 4, provoca maior índice de incorporação, alteração no teor de sólidos solúveis em relação à amostra controle e visivelmente maior uniformidade da difusão da solução no interior da amostra. Diante destes resultados, optou-se por trabalhar com as condições de -650 mmHg de pressão de vácuo e 10 min de tempo de relaxamento nos ensaios de impregnação a vácuo com as soluções de trealose nos morangos.

Condições semelhantes foram utilizadas por Velickova et al. (2013) que trabalharam com pressão de -645 mmHg e tempo de aplicação de vácuo de 14 min para introduzir soluções crioprotetores em morangos. Xie e Zhao (2004) trabalharam com morangos submetidos a tratamentos sob pressão de -710 mmHg e tempos de aplicação de vácuo e de relaxamento de 15 e 30 min. respectivamente.

Figura 5.4- Morangos submetidos aos tratamentos (a) 1, (b) 2, (c) 3 e (d) 4 do segundo planejamento.



Fonte: Autor.

### 5.2.1.3 Teste da Condição da Matriz

Na Tabela 5.6 são apresentados os teores de trealose em morangos *in natura*, morangos inteiros e cortados pela metade impregnados com solução de 100g/L de trealose sob pressão de -650 mmHg por 5 min e com tempo de relaxamento de 10 min.

Tabela 5.6- Teor de trealose em morangos *in natura*, em metades e inteiros impregnados com solução de 100 g/L de trealose.

Amostra	Teor de Trealose (g trealose/100 g amostra) (**)
Morango <i>in natura</i>	0,00 ± 0,00 <sup>c</sup>
Morango em metade impregnado	1,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
Morango inteiro impregnado	0,13 ± 0,02 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

(\*\*) Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n=2)

Na análise por HPLC não foi identificado pico expressivo no tempo de corrida da trealose nos morangos *in natura* indicando, assim, que a trealose não está presente naturalmente em morangos e que toda a quantificação nos morangos impregnados é oriunda do tratamento. Houve diferença significativa no teor de trealose dos morangos

em metades e inteiros impregnados com solução de trealose. Os morangos pela metade apresentaram teor de trealose aproximadamente 8,5 vezes maior do que o teor dos morangos inteiros.

A diminuição do tamanho da amostra facilita a difusão da solução por todo seu volume através dos espaços intercelulares e, assim, a solução consegue atingir o centro da amostra de forma mais rápida, garantindo que todo o volume contenha trealose devido à diminuição da distância entre a superfície e o centro da amostra (FITO; PASTOR, 1994).

Na literatura, não há registros de comparação entre impregnação de amostra inteira e partida. Alguns autores comentam que a casca que envolve algumas frutas, como a pera, comporta-se como uma barreira natural que dificulta a permeação do líquido na amostra. Realizando o corte da fruta e expondo a parte mais porosa ao líquido, a impregnação é efetivada. A avaliação, neste caso, foi feita visualmente (MARCUSI, 2005).

Alguns trabalhos avaliam a impregnação a vácuo de morangos em metades (CASTELLÓ; FITO; CHIRALT, 2006; RENO; PRADO; RESENDE, 2011), em fatias (XIE; ZHAO, 2004) e inteiros (MORENO et al., 2012; VELICKOVA et al., 2013) Porém nenhum dos trabalhos citados apresenta o teor de trealose, ou do açúcar impregnado, presente na amostra após impregnação para que seja possível realizar uma comparação efetiva.

### 5.2.2 Avaliação da Impregnação a Vácuo das Soluções de Trealose em Morangos Cortados pela Metade

A Tabela 5.7 apresenta os resultados da impregnação a vácuo em relação ao índice de incorporação, teor de umidade, sólidos solúveis e teor de trealose das amostras cortadas pela metade e impregnadas com soluções de trealose de diferentes concentrações.

Tabela 5.7- Índice de incorporação, teor de umidade, sólidos solúveis e trealose nas amostras em metades impregnadas com soluções de trealose sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min.

Tratamento	Índice de Incorporação (%)	Teor de Umidade (%)	Teor de Sólidos Solúveis (°Brix)	Teor de Trealose (g trealose/ 100 g amostra)
Controle ( <i>in natura</i> )		94,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,5 <sup>c</sup>	
100 g trealose /L	7,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	94,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	4,8 ± 0,6 <sup>c</sup>	1,5 ± 0,4 <sup>c</sup>
300 g trealose /L	2,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	93,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>b</sup>
500 g trealose /L	1,0 ± 0,4 <sup>c</sup>	92,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	7,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,4 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

(\*\*) Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n=6)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.7, quanto menor a concentração da solução de tratamento, maior o índice de incorporação. Segundo a Equação (3.2), o aumento de volume de líquido incorporado é inversamente proporcional à viscosidade da solução. Devido a isso, a diferença no índice de incorporação das amostras tratadas com soluções de diferentes concentrações se dá pela diferença na viscosidade das soluções, já que todas as demais condições experimentais foram mantidas. Analisando os valores de viscosidade das soluções apresentados na seção 5.1.2, percebe-se que os resultados corroboram entre si e estão de acordo com a Equação (3.2). As amostras tratadas com soluções mais concentradas, que apresentam maior viscosidade, apresentam menor índice de incorporação. Guillemin et al. (2008) verificaram o mesmo efeito da viscosidade da solução com a impregnação a vácuo de maçãs com soluções de alginato e de sacarose.

O índice de incorporação é utilizado para quantificar a variação de massa da amostra em função do processo de impregnação. Pode-se utilizar o índice como parâmetro para comparar a efetividade de diferentes condições de tratamento, desde que a solução e a amostra não variem nos ensaios. Via de regra, quanto maior o índice mais impregnação ocorreu. Não se pode dizer, entretanto, que nas amostras que apresentam maior índice de incorporação há maior quantidade de trealose quando se comparam amostras tratadas com soluções de diferentes concentrações. Isso se deve ao fato do índice relacionar massa de solução, e não a massa de trealose, com a massa da amostra.

Para se fazer esta verificação, pode-se calcular a massa de solução impregnada a partir do teor de trealose determinado em cada amostra. O teor de trealose,  $Tt$ ,

(g trealose/100 g amostra) relaciona-se com o volume de solução que penetra a amostra,  $v_s$ , (mL solução/100 g amostra) e com a concentração da solução,  $C$ , (g trealose/mL solução) conforme a Equação (5.2):

$$T_t = v_s C \quad (5.2)$$

O volume da solução impregnada,  $v_s$ , por sua vez, relaciona-se com a massa de solução impregnada,  $m$ , através da multiplicação da massa específica da solução,  $\rho$ , como mostra a Equação (5.3)

$$m = v_s \rho \quad (5.3)$$

O volume e a massa de solução incorporada obtidos a partir das Equações (5.2) e (5.3) são apresentados na Tabela 5.8. Conforme pode ser observado nas Tabela 5.7 e Tabela 5.8, quando se comparam soluções de diferentes concentrações, maior índice de incorporação, não significa maior teor de trealose na amostra. A quantidade de massa de solução introduzida na amostra tratada com solução a 100 g/L é o dobro da quantidade introduzida na amostra tratada com solução a 500 g/L. O teor de trealose nas amostras, por sua vez, tem o comportamento contrário. Visto que o objetivo é ter a maior quantidade de trealose na amostra, a solução de 500 g/L foi mais efetiva, pois apresentou o maior teor na amostra.

Tabela 5.8- Volume e massa teóricos de solução de trealose incorporados nos diferentes tratamentos em função da concentração das soluções utilizadas

<b>Solução de tratamento</b>	<b>Volume de solução incorporado (mL de solução/ 100 g amostra)</b>	<b>Massa de solução incorporada (g solução/ 100g amostra)</b>
100 g trealose /L	15,3	15,79
300 g trealose /L	7,13	7,89
500 g trealose /L	6,66	7,86

Durante a aplicação do vácuo, junto com os gases, saem também líquidos presentes nos espaços intercelulares e, por ventura, outras partes sólidas da amostra (ZHAO; XIE, 2004). Por essa razão, o índice de impregnação não é um método quantitativo eficaz, visto que quantifica variação de massa e não o valor absoluto do soluto incorporado. A Figura 5.5 mostra uma fotografia da solução de trealose após o processo de impregnação. É possível observar que na solução que passou pelo processo

de impregnação, há vestígios da amostra, comprovando a perda de massa da amostra durante o processo.

Figura 5.5- Solução de trealose após processo de impregnação a vácuo.



Fonte: Autor.

O efeito da concentração da solução nos morangos é significativo também no teor de sólidos solúveis e de umidade, resultados que corroboram com os discutidos anteriormente. Morangos impregnados com solução de trealose a 100 g trealose/L não sofreram diferença significativa no teor de umidade e de sólidos solúveis em relação ao morango *in natura*. Os morangos impregnados com solução de 300 e 500 g trealose/L, por sua vez, apresentaram diferença significativa sendo que, quanto mais concentrada a solução de impregnação menor a umidade e maior a concentração de sólidos solúveis nos morangos. Esses resultados são efeitos esperados da impregnação, visto que são introduzidas nos espaços vazios do morango soluções com maior concentração de sólidos solúveis que a matriz.

Em relação à textura, a Tabela 5.9 mostra os valores de força máxima de pico das amostras *in natura* e após impregnação. Como pode ser visto, a impregnação não alterou significativamente a força de pico indicando que o processo de impregnação na amostra não causou rupturas ou danos celulares, uma vez que esses afetam diretamente as propriedades mecânicas dos alimentos, entre elas, a textura (CHIRALT et al., 2001).

Tabela 5.9- Força máxima de pico da amostra *in natura* e após impregnação a vácuo sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min.

Tratamento	Força máxima de pico (N)
Controle ( <i>in natura</i> )	176 ± 19 <sup>a</sup>
100 g trealose/L	148 ± 21 <sup>a</sup>
300 g trealose/ L	176 ± 22 <sup>a</sup>
500 g trealose/L	145 ± 18 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

(\*\*) Valores médios ± desvio padrão de n repetições (n=5)

Em estudo realizado por Neri et al. (2016), cubos de maçã submetidos à impregnação a vácuo de água sob diferentes pressões foram analisados em relação à textura. Os autores verificaram que as amostras submetidas a pressões mais baixas que -382 mmHg diminuíram a força de pico significativamente. De acordo com os autores, as pressões de vácuo muito elevadas afetavam a estrutura das células provocando o rompimento das mesmas. Visto que o processo de impregnação a vácuo causa a expansão dos gases internos e a saída de líquido do interior da amostra, a estrutura das células pode ser afetada causando danos que alteram o comportamento mecânico da amostra. Moreno et al. (2012), ao impregnarem morangos com soluções de sacarose a 65 °Brix sob pressão de -720 mmHg variando a temperatura em 30, 40 e 50 °C, verificaram que não houve diferença significativa em relação à variação de força máxima entre as amostras tratadas e a amostra controle.

A Tabela 5.10 apresenta os resultados da análise colorimétrica das amostras *in natura* e após impregnação. Conforme pode ser observado nesta tabela, não houve diferença significativa nos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , *Hue* e *Croma* medidos na parte externa do morango devido à impregnação a vácuo; na parte interna do morango, por sua vez, o processo de impregnação a vácuo causou alterações na cor das amostras.

Tabela 5.10- Resultados da análise colorimétrica em relação aos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $Hue$  e  $Croma$  das amostras *in natura* e após impregnação a vácuo sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min.

<b>Tratamento</b>	<b><math>L^*</math></b>	<b><math>a^*</math></b>	<b><math>b^*</math></b>	<b><math>Hue</math></b>	<b><math>Croma</math></b>
<b>Face externa</b>					
<i>In natura</i>	$56 \pm 2^a$	$61 \pm 2^a$	$24 \pm 1^a$	$0,36 \pm 0,05^a$	$66 \pm 2^a$
100 g trealose/L	$57 \pm 2^a$	$58 \pm 1^a$	$19 \pm 4^a$	$0,30 \pm 0,05^a$	$61 \pm 3^a$
300 g trealose/L	$58 \pm 2^a$	$55 \pm 5^a$	$17 \pm 5^a$	$0,31 \pm 0,07^a$	$61 \pm 9^a$
500 g trealose/L	$60 \pm 4^a$	$59 \pm 4^a$	$21 \pm 4^a$	$0,33 \pm 0,04^a$	$61 \pm 5^a$
<b>Face interna</b>					
<i>In natura</i>	$92 \pm 4^a$	$64 \pm 4^a$	$23 \pm 6^a$	$0,34 \pm 0,06^a$	$67 \pm 4^b$
100 g trealose/L	$69 \pm 7^b$	$53 \pm 4^a$	$17 \pm 4^a$	$0,30 \pm 0,05^a$	$55 \pm 6^{ab}$
300 g trealose/L	$68 \pm 11^b$	$51 \pm 5^a$	$14 \pm 4^a$	$0,28 \pm 0,05^a$	$53 \pm 8^{ab}$
500 g trealose/L	$74 \pm 4^b$	$49 \pm 9^a$	$14 \pm 8^a$	$0,3 \pm 0,1^a$	$49 \pm 11^a$

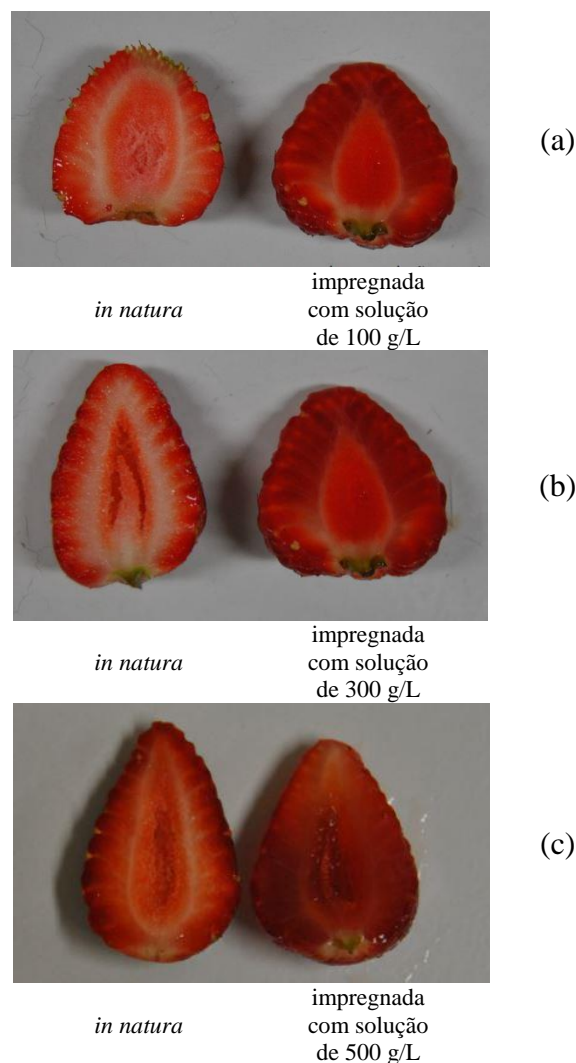
\*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

(\*\*) Valores médios  $\pm$  desvio padrão de n repetições (n=3)

A introdução da solução de trealose diminuiu o parâmetro  $L^*$  (que indica a luminosidade da amostra e que varia do preto (0) até o branco (100)). O efeito ocorreu com todos os tratamentos, sendo que a variação de concentração da solução não provocou diferença significativa nos valores. A diminuição no valor de  $L^*$  se deve pela substituição parcial ou total do ar presente nos espaços intercelulares pela solução impregnada (MORENO et al., 2000). A Figura 5.6 mostra um comparativo entre os morangos *in natura* e após impregnação. Percebe-se que os morangos da esquerda - amostras *in natura* - são mais claros que os morangos da direita - amostras impregnadas com solução a 100, 300 e 500 g de trealose/L.



Figura 5.6- Comparação entre morangos *in natura* e morangos impregnados com solução de trealose a (a) 100g/L, (b) 300 g/L e (c) 500 g/L sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min.



Fonte: Autor.

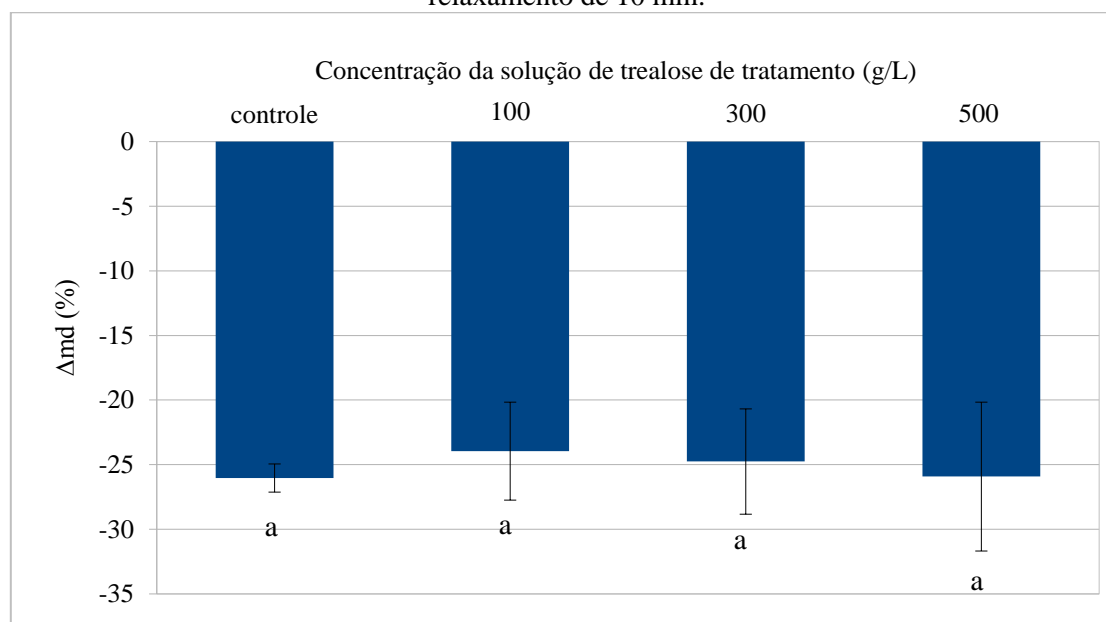
Moreno et al. (2004) verificaram redução de 20% no valor de  $L^*$  em amostras de papaia impregnados com solução de sacarose a 55 e 65 °Brix. Também foi observada diminuição no valor de  $L^*$  em peras impregnadas com solução de sacarose a 65 °Brix por Moreno et al. (2011).

### 5.3 Avaliação do Efeito Crioprotetor da Trealose em Morangos

A Figura 5.7 apresenta a variação de massa das amostras que sofreram impregnação com soluções de trealose a 100, 300 e 500 g/L, foram congeladas e

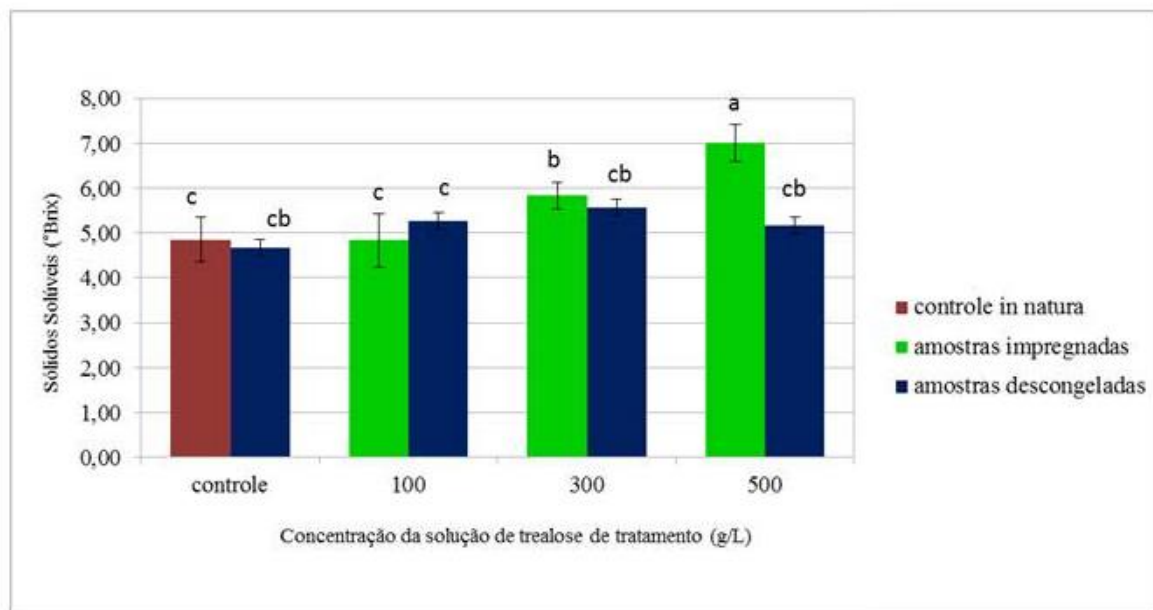
descongeladas. Todas as amostras, sem e com impregnação a vácuo, sofreram perda de massa após descongelamento conforme apresentado na figura. A impregnação da trealose não alterou significativamente a perda de massa após o descongelamento. O objetivo da impregnação de crioprotetores é a preservação da qualidade do produto após o congelamento/descongelamento do mesmo. Assim, deseja-se que este perca a menor quantidade de água possível durante o descongelamento. Velickova et al. (2013) obtiveram perdas em torno de 25% em morangos impregnados com solução a 12% de trealose. Este valor, para os autores, significou redução de 22% de perda de água em relação a morangos congelados sem tratamento.

Figura 5.7- Variação de massa das amostras após descongelamento de amostras impregnadas com soluções de 100, 300 e 500 g/L com pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min.



Embora a quantidade de massa perdida seja estatisticamente igual entre as amostras, o conteúdo da massa difere nas amostras entre si. Conforme comparação apresentada na Figura 5.8, o descongelamento provocou diminuição na concentração de sólidos solúveis da amostra impregnada com solução de 500 g/L, sendo essa alteração responsável por parte da massa liberada pela amostra. Nas amostras impregnadas com solução a 100 e 300 g/L, percebe-se que a quantidade de trealose introduzida foi mais próxima da quantidade capaz de se ligar às paredes celulares, ocorrendo menor expulsão de sólidos solúveis durante o descongelamento.

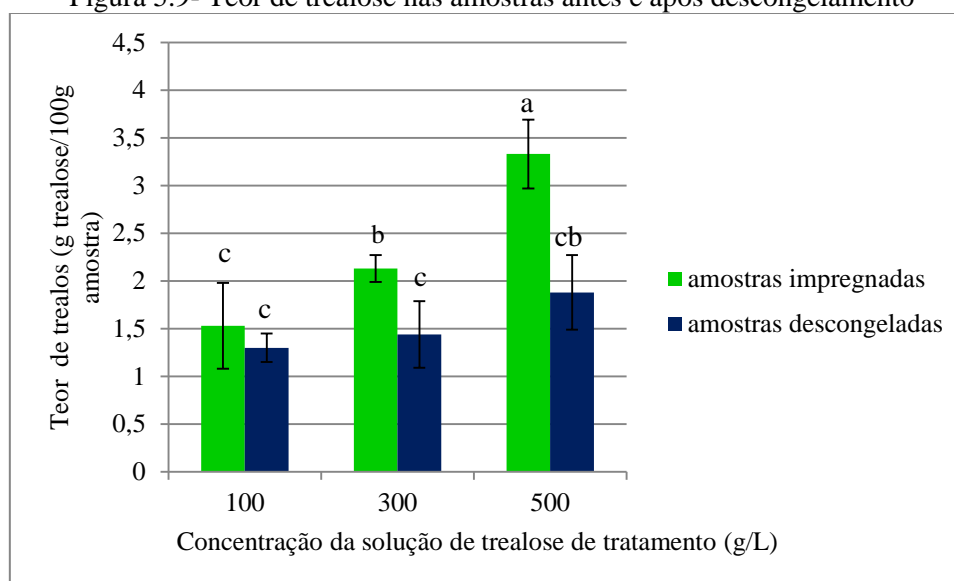
Figura 5.8- Teor de sólidos solúveis nas amostras antes e após descongelamento



Fonte: Autor

Em amostras impregnadas com trealose por Hinch (1989), observou-se que soluções muito concentradas de trealose não possuíam maior efeito crioprotetor que soluções menos concentradas. Isso se deve, de acordo com o autor, à saturação dos possíveis sítios antes disponíveis para ligações entre as membranas e a trealose. A saturação destes sítios pode ser o motivo da perda de sólidos solúveis das amostras impregnadas com soluções a 500 g/L após descongelamento. Especula-se que a trealose que não se ligou à parede celular ficou dissolvida na água e foi liberada durante o descongelamento. É possível perceber isso também através da comparação dos teores de trealose nas amostras impregnadas e descongeladas que são apresentadas na Figura 5.9.

Figura 5.9- Teor de trealose nas amostras antes e após descongelamento

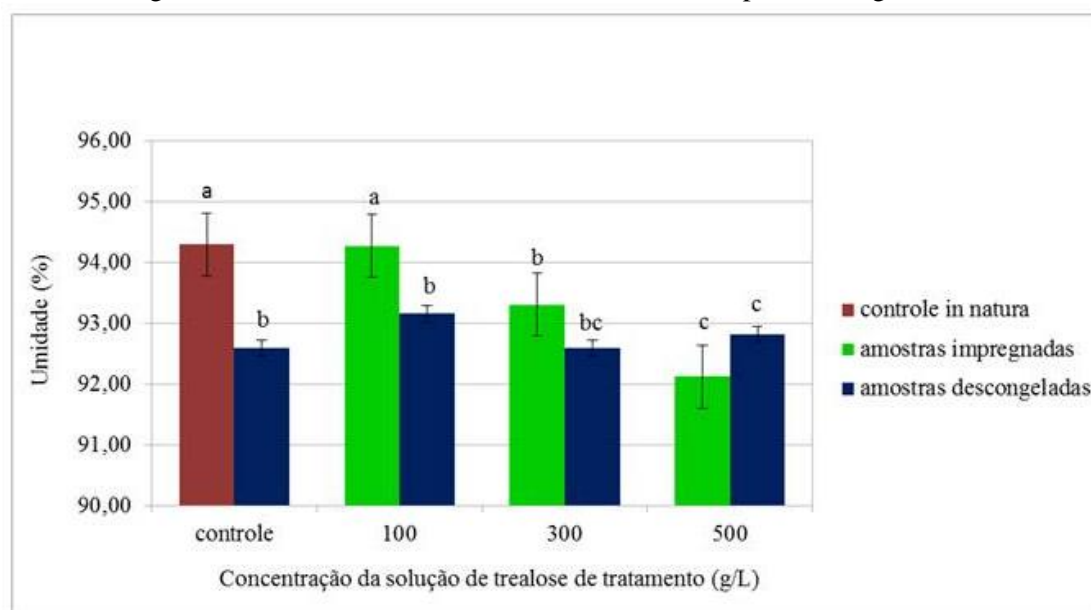


Fonte: Autor

Percebe-se que o teor de trealose nas amostras após descongelamento diminuiu em relação à amostra impregnada. Nos morangos tratados com solução de 100 g/L, o teor tende a permanecer constante, ou seja, a trealose que permanece na amostra após descongelamento é, provavelmente, a trealose que ficou aderida na parede celular. A porção de trealose que não se adere às células fica nos espaços intercelulares e é expulsa durante o descongelamento.

A Figura 5.10 faz uma comparação dos teores de umidade das amostras após impregnação e após descongelamento, sendo a amostra controle os morangos sem tratamento *in natura* descongelados. Em relação ao teor de umidade, somente as amostras impregnadas com soluções a 300 e 500 g/L não sofreram alterações significativas após o descongelamento. Nas amostras impregnadas com solução a 100 g/L e na amostra controle, ocorreu perda de umidade significativa, o que é indesejável, já que a perda de líquido é um dos parâmetros mais importantes na determinação da qualidade de produtos descongelados. Durante a perda de líquido, ocorre também a perda de vitaminas, além de provocar danos à textura (GRUDA; POSTOLSKI, 1986).

Figura 5.10- Teor de umidade das amostras antes e após descongelamento



Fonte: Autor

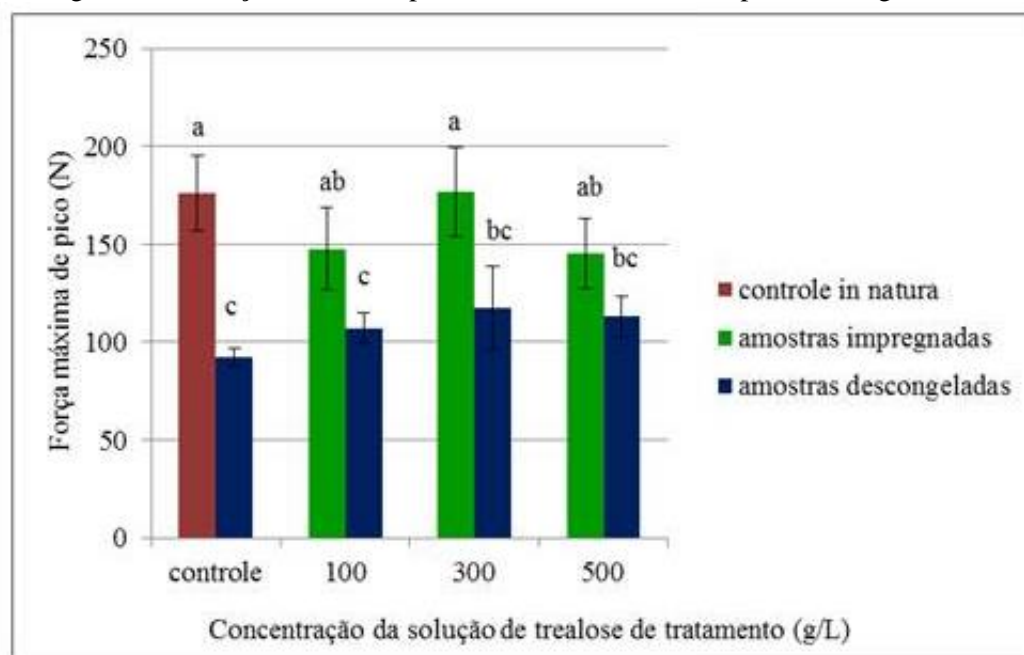
De acordo com Heldman e Hartel (1998), no processo de congelamento lento, a formação de gelo inicia-se pela água intercelular. À medida que o gelo se forma, diminui a quantidade de água e aumenta a quantidade de sólidos dissolvidos na água livre. Devido à alta concentração nos espaços intercelulares, ocorre migração de água do interior das células para equilibrar as concentrações.

Segundo Bakás e Disalvo (1991), a trealose liga-se aos fosfolipídeos da membrana celular formando uma barreira, diminuindo a permeabilidade da membrana, o que evita a transferência de massa. Segundo Patist e Zoerb (2005), a efetividade da trealose como crioprotetor se dá, também, pela sua capacidade de romper a estrutura tetraédrica da água reduzindo, assim, a quantidade de água livre, visto que a água livre forma cristais de gelo que podem causar danos irreparáveis nas paredes celulares. Nas amostras impregnadas com soluções de 300 e 500 g/L, acredita-se que uma maior quantidade de trealose permaneceu nos espaços intercelulares, o que permitiu a sua interação com a água livre e sua atuação em modificar a estrutura dos cristais de gelo formados. A amostra *in natura* e a tratada com solução a 100 g/L, por sua vez, apresentavam maior quantidade de água livre e menor quantidade de trealose, assim, a possibilidade de formação de cristais de gelo maiores nos espaços intercelulares era maior do que nas amostras tratadas com solução mais concentradas, o que provocou possíveis danos às membranas e favoreceu a desidratação da amostra.

Durante o congelamento lento, as células com alta permeabilidade tendem sempre a desidratar devido à fácil passagem de água pela membrana enquanto que células com baixa permeabilidade tendem a congelar na parte interna devido à presença de água que não migra para o exterior da célula. O congelamento no interior da célula também pode causar danos à parede celular em função do aumento do volume da água congelada; deve haver um equilíbrio na permeabilidade celular para que nenhum extremo cause danos (HUNG; ERICKSON, 1997). Por isso, às vezes, é necessária a combinação de crioprotetores intra e extracelulares para que atuem simultaneamente, reduzindo danos na parte interna e externa das células. A trealose é um crioprotetor extracelular e apresentou-se eficiente para evitar a desidratação das amostras após descongelamento, em relação às amostras impregnadas, quando introduzida em quantidades mais elevadas.

A Figura 5.11 apresenta a comparação entre os valores de força máxima de pico antes e após o descongelamento das amostras. A concentração da solução de tratamento não exerceu influência significativa na textura das amostras após descongelamento. Todas as amostras apresentaram valores estatisticamente iguais de força máxima ao nível de 5% de significância. As amostras tratadas com solução a 500 g/L, porém, não sofreram alterações de textura após descongelamento. As demais amostras tiveram diminuição no valor da força o que indica que a estrutura celular sofreu danos que causaram o amolecimento das amostras.

Figura 5.11- Força máxima de pico nas amostras antes e depois descongelamento.



Fonte: Autor.

Em relação à amostra impregnada, a amostra descongelada tratada com solução a 500 g/L de trealose é estatisticamente igual. Percebe-se que a trealose protegeu a amostra dos danos causados pelo congelamento e descongelamento. O fato do valor da força ser estatisticamente igual ao valor da força na amostra de morango sem tratamento descongelado sugere que os danos foram causados pelo processo de impregnação a vácuo, somados aos pequenos danos causados pelo congelamento.

Xie e Zhao (2004) minimizaram os efeitos na textura devido ao congelamento introduzindo solução de frutose (50 °Brix) em morangos. De acordo com os autores, o incremento na força máxima de pico deve-se pela presença da solução nos espaços intercelulares que impediu a deformação das células associado à redução do teor de água. A presença da solução superou o dano tecidual causado pelo processo de impregnação a vácuo associado ao processo de congelamento e descongelamento. Além disso, foi adicionado lactato de cálcio (12% em massa) à solução crioprotetor, o que aumentou a resistência dos tecidos devido à coesão e integridade celular.

As mudanças provocadas pela transição da água para gelo durante o congelamento é a principal causa dos danos celulares. A formação de gelo extracelular, que provoca a desidratação das células, é a primeira causa identificada dos danos. Outra causa identificada posteriormente é a formação de gelo intracelular. Os mecanismos exatos dos danos intracelulares não estão bem claros ainda, mas sabe-se que quando o

congelamento ocorre de forma lenta, ocorrem danos às membranas e às organelas celulares, além de ocorrer a formação de bolhas devido ao potencial osmótico e à formação dos cristais de gelo.

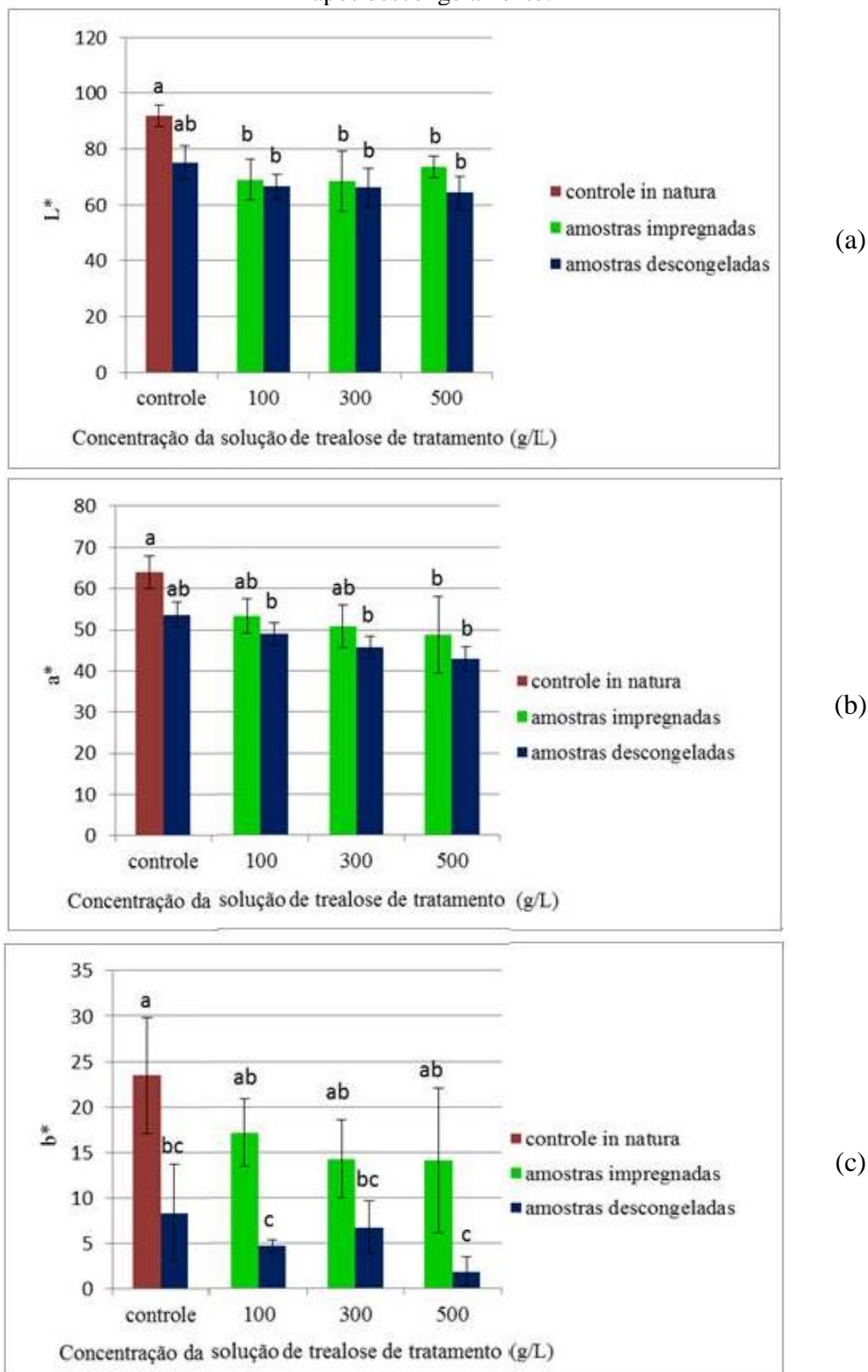
O poder crioprotetor é complexo já que deve agir em vários locais simultaneamente. Devido a isso, alguns crioprotetores são mais eficientes que outros em diferentes matrizes (FULLER, 2004). A trealose é um crioprotetor extracelular (ERDAG et al., 2002) e, assim, não permeia para o interior das células das amostras a fim de interagir com a água presente e evitar os danos causados pela formação de gelo intracelular. Dessa forma, como pode ser observado pelos resultados, a trealose tende a diminuir os danos estruturais causados pelo congelamento e descongelamento, visto que, provavelmente, minimizou os danos extracelulares causados pelo congelamento.

Os resultados da análise colorimétrica são apresentados nas Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15 que mostram a comparação dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , *Hue* e *Croma* das amostras após impregnação e após descongelamento na parte interna e externa dos morangos, respectivamente. Durante o processo de congelamento e descongelamento os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e *Croma*, que representam a luminosidade, do preto (0) ao branco (100), da cor verde (-) ao vermelho (+) e a saturação percebida como a intensidade da cor, respectivamente, não sofreram variação significativa em nenhuma das faces. O parâmetro  $b^*$ , que representa as cores do azul (-) ao amarelo (+) sofreram variação somente na face interna das amostras, que são percebidas também no parâmetro *Hue* que representa o ângulo do tom.

As amostras tiveram diminuição no valor de  $b^*$  medido na face interna, tornando-se menos amarelas após o descongelamento. As alterações podem ser decorrentes de mudanças no pH que geram alterações nas antocianinas presentes no morango (FELLOWS, 2007). A concentração da solução de trealose utilizada nos tratamentos não exerceu influência significativa nos parâmetros de cor avaliados.

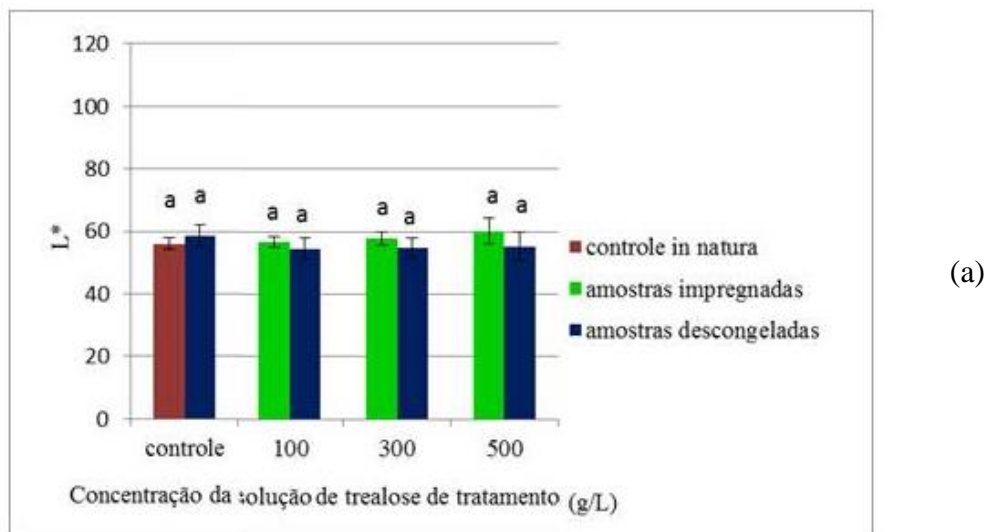


Figura 5.12- Valores dos parâmetros (a)  $L^*$ , (b)  $a^*$  e (c)  $b^*$  da face interna dos morangos antes e após descongelamento.

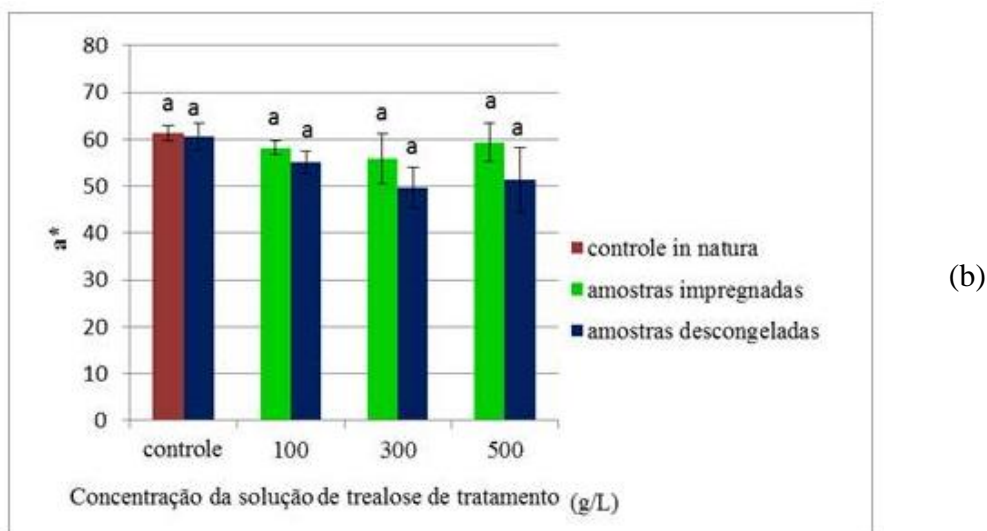


Fonte: Autor.

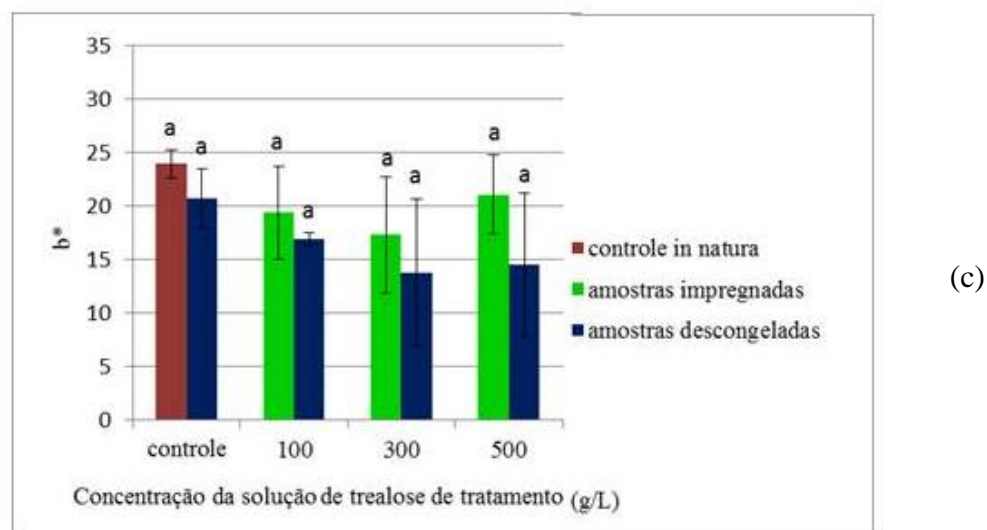
Figura 5.13- Valores dos parâmetros (a)  $L^*$ , (b)  $a^*$  e (c)  $b^*$  da face externa dos morangos antes e após descongelamento.



(a)



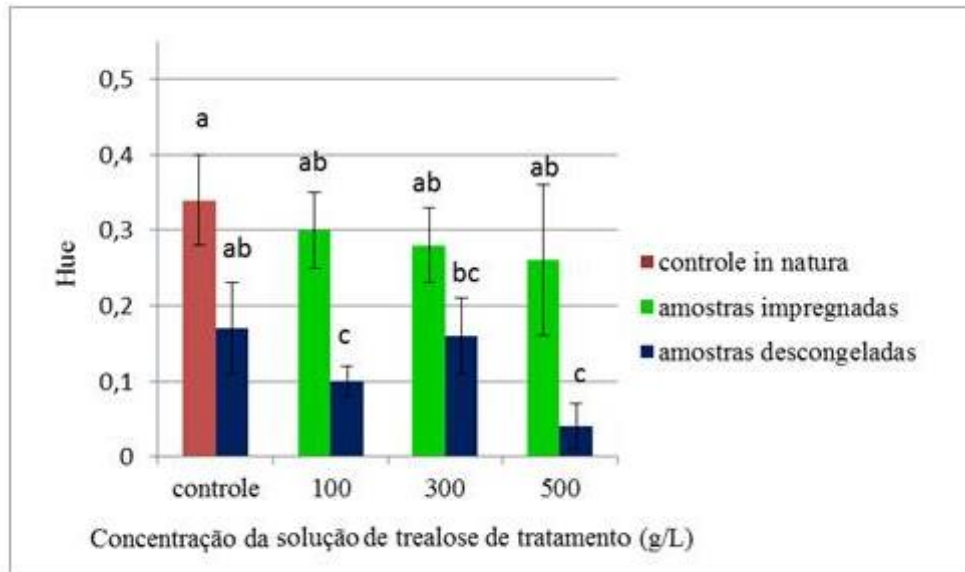
(b)



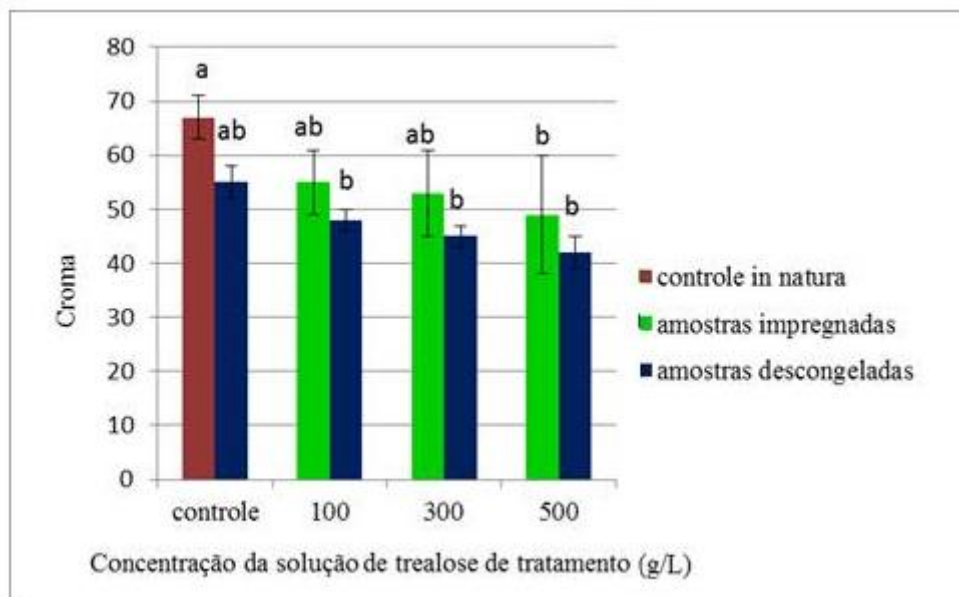
(c)

Fonte: Autor.

Figura 5.14- Valores dos parâmetros (a) *Hue* e (b) *Croma* da face interna dos morangos antes e após descongelamento.



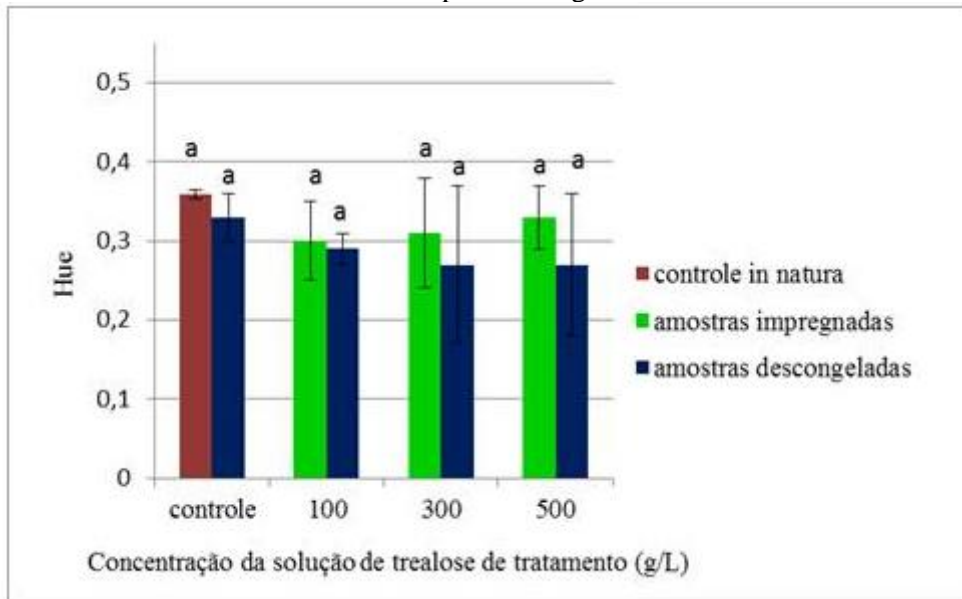
(a)



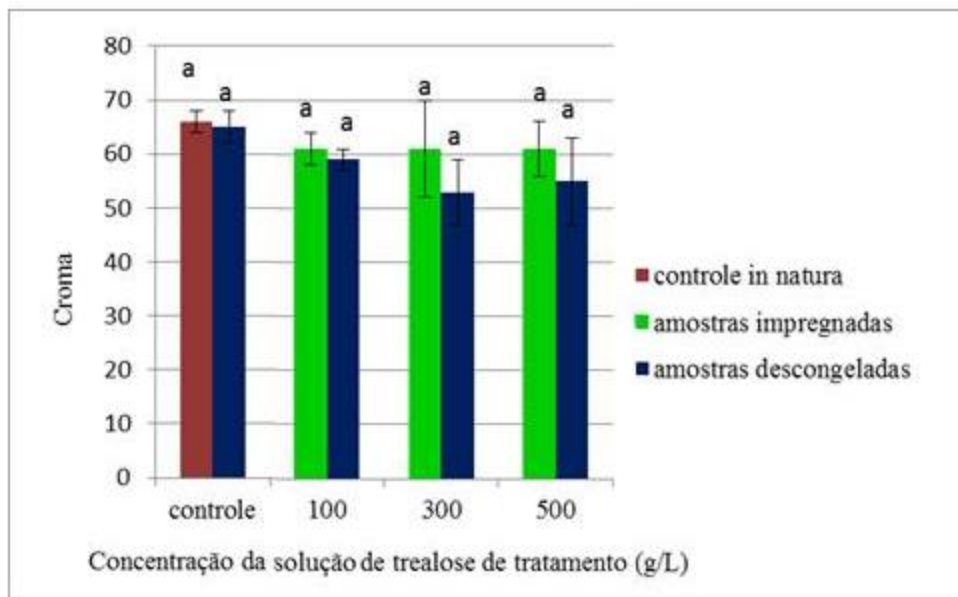
(b)

Fonte: Autor.

Figura 5.15- Valores dos parâmetros (a) *Hue* e (b) *Croma* da face externa dos morangos antes e após descongelamento.



(a)

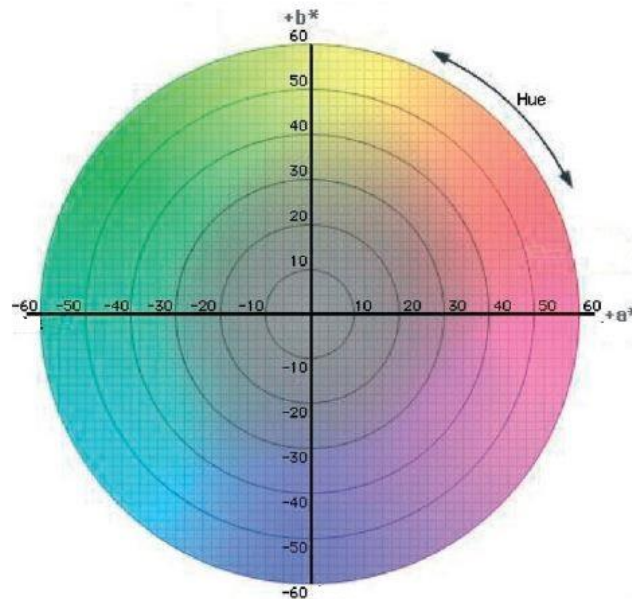


(b)

Fonte: Autor.

A Figura 5.16 apresenta o diagrama que relaciona os parâmetros do espaço CIELAB:  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ , *Hue* e *Croma*. Percebe-se no diagrama, que a diminuição do parâmetro *Hue* na face interna dos morangos está relacionada com a diminuição do parâmetro  $b^*$  e que o tom das amostras após descongelamento está mais próximo dos valores positivos de  $a^*$  do que dos valores positivos de  $b^*$ .

Figura 5.16 - Diagrama que relaciona os parâmetros dos espaço CIELAB.

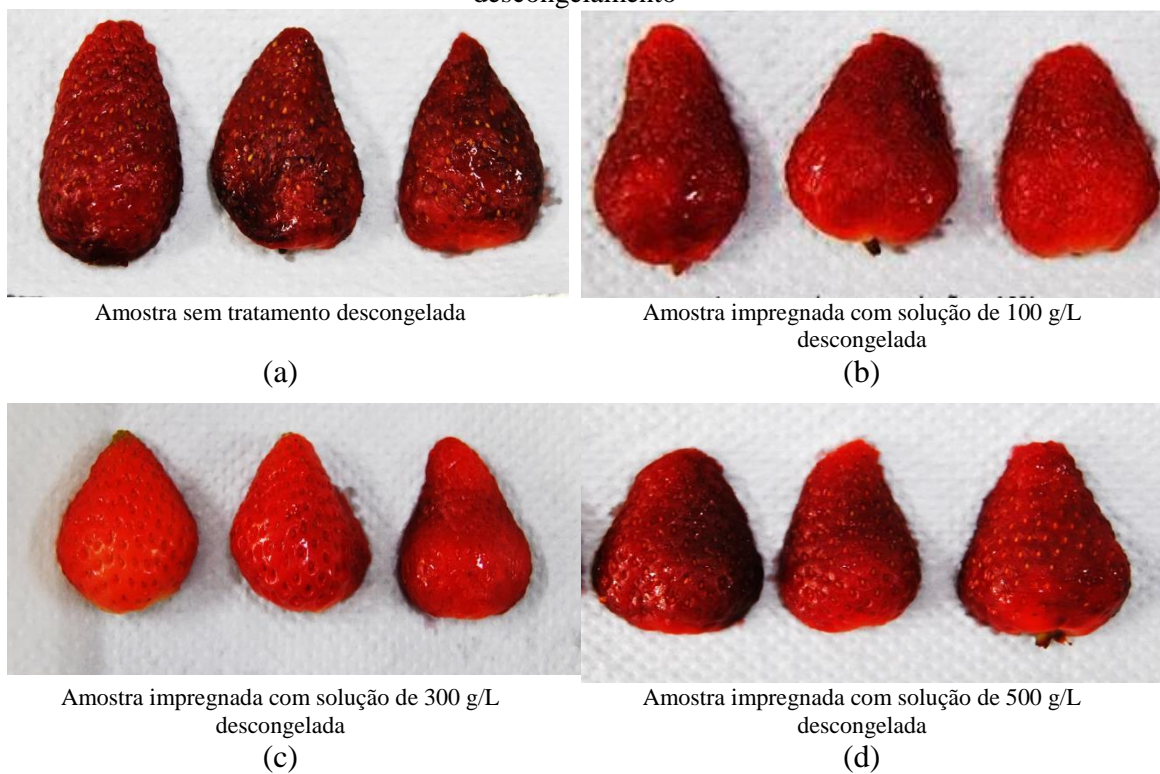


Fonte: Adaptado de MINOLTA (2003).

As alterações de cor nos produtos congelados são perceptíveis ao longo do tempo de estocagem, visto que geralmente ocorrem não devido ao processo de congelamento em si, mas, de modo geral, em função da ação de enzimas que não são inativadas a baixas temperaturas (HELDMAN; HARTEL, 1998). Xie e Zhao (2004) verificaram diminuição nos valores de  $a^*$  e  $b^*$  em morangos impregnados com soluções de frutose e pectina contendo cálcio e zinco após as mesmas serem descongeladas. Os autores atribuíram essas variações à presença de cálcio na solução de impregnação.

A Figura 5.17 apresenta fotografias dos morangos para comparação entre as amostras após o descongelamento. Como pode ser visto nesta figura, a olho nu, as amostras tratadas apresentaram melhor aspecto após descongelamento tanto em relação à textura e à integridade, como em relação à cor. As amostras sem tratamento, após descongelamento, apresentaram pontos indicativos de queimadura pelo frio, além de injúrias que diminuíam a sua integridade. Estas injúrias são pouco perceptíveis nas amostras impregnadas. A trealose formou uma camada protetora que envolveu os morangos tratados e impediu a desidratação superficial que causa as queimaduras pelo frio.

Figura 5.17- Morangos (a) sem tratamento, tratados com solução a (b) 100 g/L, (c) 300 g/L e (d) 500 g/L sob pressão de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min, após descongelamento



Fonte: Autor

## Capítulo 6- Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

O presente trabalho apresentou um estudo sobre a impregnação a vácuo em morangos com soluções de azul de metileno e de trealose em diferentes concentrações. Foram verificadas as alterações provocadas pelo processo de impregnação e o poder crioprotetor da trealose após congelamento e descongelamento das amostras.

A pressão de vácuo aplicada durante o processo de impregnação a vácuo e o tempo de relaxamento exerceram influência significativa no índice de impregnação e no teor de sólidos solúveis dos morangos impregnados com solução de azul de metileno. A variação do tempo de aplicação de vácuo não causou alterações significativas no índice de incorporação e no teor de sólidos solúveis das amostras.

Não foi identificado pico no tempo de corrida da trealose em morangos *in natura*. Em morangos impregnados com solução de trealose de 100 g/L, verificou-se que houve aumento de 8,5 vezes no teor de trealose quando os morangos impregnados estavam cortados em metades.

Entre as faixas de condições estudadas, determinou-se a partir dos resultados preliminares que as melhores condições para realização da impregnação a vácuo em morangos era de pressão de vácuo de -650 mmHg por 5 min e tempo de relaxamento de 10 min, com morangos cortados em metades na seção longitudinal.

A concentração da solução de trealose exerceu influência significativa no índice de incorporação, no teor de umidade, no teor de sólidos solúveis e no teor de trealose dos morangos. O aumento da concentração da solução diminuiu o índice de incorporação, porém resultou no aumento do teor de trealose devido às diferenças entre os valores da massa específica e da viscosidade das soluções.

Os morangos impregnados com solução de 100 g/L não sofreram alterações significativas em relação ao teor de umidade e de sólidos solúveis em relação aos morangos *in natura* devido à proximidade do teor de sólidos solúveis da solução e dos frutos. Em morangos impregnados com soluções de 300 e 500 g/L houve aumento significativo no teor de sólidos solúveis e diminuição do teor de umidade.

A textura, avaliada através da força máxima de pico para destruição de 95% dos morangos, não sofreu diferença significativa com o processo de impregnação a vácuo, indicando que não ocorreram rupturas celulares significativas durante o processo.

A face externa dos morangos impregnados não sofreu variações de cor quando comparados aos morangos *in natura*. A face interna das metades sofreu diminuição da luminosidade devido à substituição do ar presente nos espaços intercelulares pelas soluções de trealose. A concentração da solução não exerceu influência significativa nos resultados.

Todas as amostras, tratadas com impregnação a vácuo e sem tratamento, sofreram perda de massa estatisticamente igual após congelamento e descongelamento. A efetividade da trealose é percebida pela análise de umidade e sólidos solúveis, visto que o método de variação de massa quantifica a massa total perdida. Em relação à perda de umidade após o descongelamento, percebe-se que, nas amostras tratadas com soluções a 300 e 500 g/L, não houve diferença significativa do teor de umidade indicando que estas soluções são mais efetivas por evitar a desidratação das células. Nas amostras impregnadas com solução a 100 g/L, por sua vez, o efeito crioprotetor não foi efetivo pois ocorreu perda de umidade após o descongelamento.

O teor de sólidos solúveis da amostra tratada com solução a 500 g/L diminuiu após o descongelamento. Essa liberação de sólidos deve-se à quantidade de trealose que provavelmente não se ligou à membrana celular e foi liberada junto com a água durante o descongelamento. O teor de trealose nas amostras após descongelamento tende a permanecer constante independente da concentração da solução de tratamento. A provável causa da liberação de trealose após descongelamento é a saturação dos sítios ativos para ligação nas membranas celulares.

A introdução da trealose não exerceu influência significativa no valor da força máxima de pico das amostras descongeladas sendo que todas as amostras tratadas, e a amostra sem tratamento, apresentaram valores estatisticamente iguais após o descongelamento. As amostras sofreram danos durante o congelamento e descongelamento que provocaram a redução na força, ou seja, o amolecimento das amostras. A única amostra que não sofreu diminuição significativa da força após descongelamento em relação à força da amostra impregnada antes do congelamento foi a amostra tratada com solução de 500 g/L. Esta, por sua vez, apresentou força após o descongelamento igual a da amostra *in natura* descongelada possivelmente devido a danos da impregnação somados a danos do congelamento e descongelamento.

Em relação à coloração, a trealose não exerceu influência significativa. Todas as amostras sofreram variação de cor devido ao congelamento e descongelamento. As



variações diminuíram o valor do parâmetro  $b^*$ , que indicam a diminuição da cor amarela nas amostras.

Por análise visual, as amostras que passaram pela impregnação a vácuo apresentaram melhor aspecto após descongelamento que a amostra controle, que apresentou pontos de perda de integridade e queimadura devido ao frio.

Como sugestão para trabalhos futuros, sugere-se análise de microscopia das amostras após impregnação, congeladas e após descongelamento para melhor entendimento da forma como a trealose se liga às membranas celulares do morango, como ela interage com a água livre de forma a alterar a formação dos cristais de gelo e como ocorrem os danos celulares.

Sugere-se, também, o estudo da combinação da trealose com outros crioprotetores, principalmente intracelulares, a fim de minimizar os danos no interior das células e potencializar o efeito da trealose como crioprotetor.

Por fim, entende-se que seria interessante a realização de análise sensorial dos morangos para avaliar o efeito da incorporação da trealose sobre o sabor, textura e aceitabilidade do produto.

## Referências

- ABIA, A. B. DAS I. DA A. **Números do Setor**. Disponível em: <[http://www.abia.org.br/vsn/tmp\\_6.aspx?id=16](http://www.abia.org.br/vsn/tmp_6.aspx?id=16)>.
- ALLISON, S. D. et al. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 365, n. 2, p. 289–298, 1999.
- ANDRÉS-BELLO, A. et al. Vacuum impregnation as a tool to introduce biopreservatives in gilthead sea bream fillets (*Sparus aurata*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 758–765, 2015.
- ANTUNES, L. E. C. et al. Morangos do Jeito que o Consumidor gosta. **Campo & Lavoura**, v. 1, p. 64–72, 2015.
- ANTUNES, L. E. C.; HOFFMANN, A. **Pequenas Frutas**. Brasília: Embrapa, 2012.
- ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry Production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, p. 156–161, 2013.
- ANVISA, A. N. DE V. S. **Lista de Novos Ingredientes Aprovados**, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/novos-ingredientes-aprovados>>
- ATICI, Ö.; NALBANTOĞLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. **Phytochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1187–1196, 2003.
- BAKÁS, L. S.; DISALVO, E. A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. **Cryobiology**, v. 28, n. 4, p. 347–353, 1991.
- BAMPI, M.; SCHMIDT, F. C.; LAURINDO, J. B. Influência da aplicação de vácuo processos de salga de carne bovina. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1–8, 2014.
- BARBOSA-CÁNOVA, G. V.; ALTUNAKAR, B.; MEIJIA-LORIO, D. J. Freezing of fruits and vegetables An agribusiness alternative for rural and semi-rural areas AGRICULTURAL SERVICES. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, 2005.
- BELLARY, A. N. et al. Anthocyanin infused watermelon rind and its stability during storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 554–562, 2016.
- BERLINGUER, F. et al. Effects of trehalose co-incubation on in vitro matured prepubertal ovine oocyte vitrification. **Cryobiology**, v. 55, n. 1, p. 27–34, 2007.

BETORET, E. et al. Strategies to improve food functionality: Structure-property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 1–12, 2015.

BETORET, N. et al. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 2–3, p. 273–277, 2003.

BETORET, N. et al. Calcium and iron distribution in fortified vacuum-impregnated fruits determined by electron dispersion X-ray microanalysis. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, p. E26–E30, 2005.

BHANDAL, I. S.; HAUPTMANN, R. M.; WIDHOLM, J. M. Trehalose as cryoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. **Plant physiology**, v. 78, p. 430–432, 1985.

BOEIRA, J. B. **Estudo Experimental da Obtenção de Pêssego Desidratado (var. marli E Springcrest) por Desidratação Osmótica e Secagem Complementar.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

BRENNAN, J. G. et al. **Food Engineering Operations.** 3. ed. Londres: Elsevier Applied Science, 1990.

CAMPBELL, L. H.; BROCKBANK, K. G. M. Cryopreservation of Adherent Smooth Muscle and Endothelial Cells with Disaccharides. 2011.

CANTILLANO, R. F. F. Pequenas Frutas : Manuseio e Qualidade Pós-colheita. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Documentos**, n. 338, p. 34 p., 2011.

CANTILLANO, R. F. F.; SCHUNEMANN, A. P. P. Qualidade Pós-colheita de Morangos Produzidos em Sistema Orgânico e Convencional Armazenados em Atmosfera Controlada. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2015.

CASTAGNINI, J. M. et al. Vacuum impregnation and air drying temperature effect on individual anthocyanins and antiradical capacity of blueberry juice included into an apple matrix. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1289–1296, 2015.

CASTELLÓ, M. L.; FITO, P. J.; CHIRALT, A. Effect of osmotic dehydration and vacuum impregnation on respiration rate of cut strawberries. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1171–1179, 2006.

ÇENGEL, Y. A.; GHAJAR, A. J. **Transferência de Calor e Massa.** 4. ed. Formato digital: Editora McGraw-Hill, 2012.

CHINPRAHAST, N. et al. Effects of blanching and vacuum impregnation on physicochemical and sensory properties of Indian gooseberry (*phyllanthus emblica l.*). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, n. 1, p. 57–65, 2013.

CHIRALT, A. et al. Changes in mechanical properties throughout osmotic processes. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 2–3, p. 129–135, 2001.

CORRÊA, J. L. G. et al. Mass transfer kinetics of pulsed vacuum osmotic dehydration of guavas. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 498–504, 2010.

CORRÊA, J. L. G.; ERNESTO, D. B.; DE MENDONÇA, K. S. Pulsed vacuum osmotic dehydration of tomatoes: Sodium incorporation reduction and kinetics modeling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 17–24, 2016.

CREVEL, R. W. R.; FEDYK, J. K.; SPURGEON, M. J. Antifreeze proteins: Characteristics, occurrence and human exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 899–903, 2002.

CRUVINEL., R. S. R. et al. Preservação de abacaxis congelados por impregnação a vácuo de pectina e propionato de cálcio. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 40, n. 4, p. 539–548, 2009.

CRUZ, R. M. S.; VIEIRA, M. C.; SILVA, C. L. M. The response of watercress (*Nasturtium officinale*) to vacuum impregnation: Effect of an antifreeze protein type I. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 339–345, 2009.

DEROSSI, A.; DE PILLI, T.; SEVERINI, C. Reduction in the pH of vegetables by vacuum impregnation: A study on pepper. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 1, p. 9–15, 2010.

DYMEK, K. et al. Influence of vacuum impregnation and pulsed electric field on the freezing temperature and ice propagation rates of spinach leaves. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 1, p. 497–502, 2015.

EL-SHESHTAWY, R. I.; SISY, G. A.; EL-NATTAT, W. S. Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 4, n. 1, p. 26–31, 2015.

ERDAG, G. et al. Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose. **Cryobiology**, v. 44, n. 3, p. 218–228, 2002.

ERIHEMU et al. Zinc enrichment of whole potato tuber by vacuum impregnation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2352–2358, 2015.

EROGLU, A. et al. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. **Cryobiology**, v. 46, n. 2, p. 121–134, 2003.

EUROPEAN UNION COMMISSION. **Analysis of the EU Fruit and Vegetable Sector**, 2014. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/russian-import-ban/pdf/fv-production\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/russian-import-ban/pdf/fv-production_en.pdf)>

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2007.

FITO, P.; PASTOR, R. Non-diffusional mechanisms occurring during vacuum osmotic dehydration. **Journal of Food Engineering**, v. 21, n. 4, p. 513–519, 1994.

FRANÇOSONO, I. L. T. et al. Alterações físico-químicas em morangos (*Fragaria anassa* Duch.) irradiados e armazenados. **Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas**, v. 28, n. 8, p. 614–619, 2008.

FRUTAS, I.-I. B. DE. **Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Frescas- 2010/ 2009**. [s.l: s.n.].

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the Essential Antifreezes To Protect Life in the Frozen State. **CryoLetters**, v. 25, n. 6, p. 375–388, 2004.

FUMAGALLI, M. et al. Strawberry tannins inhibit IL-8 secretion in a cell model of gastric inflammation. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 703–712, 2016.

GAO, G. et al. Comparing quality changes of cupped strawberry treated by high hydrostatic pressure and thermal processing during storage. **Food and Bioprocess Processing**, v. 100, n. 17, p. 221–229, 2016.

GARDE, J. J. et al. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 3–4, p. 384–401, 2008.

GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, p. 9–19, 2012.

GIAMPIERI, F. et al. Strawberry consumption alleviates doxorubicin-induced toxicity by suppressing oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 94, p. 128–137, 2016.

GONÇALVES, E. D. et al. **Manutenção da qualidade pós-colheita das pequenas frutasInforme Agropecuário**. [s.l: s.n.].

GONÇALVEZ, A. M. et al. **Cultivares de Morangueiro de Dias Curtos para a Região de Pelotas-RSComunicado Técnico 322**. Pelotas: [s.n.].

GRIFFITH, M.; EWART, K. V. \*Department of BioloD, , University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G I and \*\*Research Inatitute, The Hospital for Sick Children, 555 University Avenue, Toronto, Ontario, Canada MSG 1X8. v. 13, n. 3, p. 375–402, 1995.

GRUDA, Z.; POSTOLSKI, J. **Tecnologia de la Congelacion de los Alimentos**. 1. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1986.

GUILLEMIN, A. et al. Influence of impregnation solution viscosity and osmolarity on solute uptake during vacuum impregnation of apple cubes (var. Granny Smith). **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 4, p. 475–483, 2008.

HELDMAN, D. R.; HARTEL, R. W. **Principles of Food Processing**. 2. ed. Maryland: Aspen Publishers, 1998.

HIGASHIYAMA, T. Novel functions and applications of trehalose. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1263–1269, 2002.

HINCHA, D. K. Low concentrations of trehalose protect isolated thylakoids against mechanical freeze-thaw damage. **BBA - Biomembranes**, v. 987, n. 2, p. 231–234, 1989.

HIRONAKA, K. et al. Ascorbic acid enrichment of whole potato tuber by vacuum-impregnation. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 1114–1118, 2011.

HOLMAN, J. P. **Heat Transfer**. 6. ed. Área Central de Singapura: McGraw-Hill Book Company, 1986.

HORNEDO-ORTEGA, R. et al. Influence of storage conditions on the anthocyanin profile and colour of an innovative beverage elaborated by gluconic fermentation of strawberry. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 198–209, 2016.

HORVÁTH, Á.; MISKOLCZI, E.; URBÁNYI, B. Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources**, v. 16, n. 5, p. 457–460, 2003.

HUANG, J. et al. Effect of sugars on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1–2, p. 25–35, 2008.

HUEHNE, P. S.; BHINIJA, K. Application of cryoprotectants to improve low temperature storage survival of orchid seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 186–193, 2012.

HUNG, Y. C.; ERICKSON, M. C. **Quality in Frozen Food**. Nova York: Chapman & Hall, 1997.

IBRAF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Comparativo das Exportações Brasileiras de Frutas Processadas 2010 / 2009**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <file:///G:/Artigos para 2o seminário/Dia 2/Comparativo\_das\_Exportações\_Brasileiras\_de\_Frutas\_Processadas\_2010-2009.pdf>.

IGUAL, M. et al. Influence of vacuum impregnation on respiration rate, mechanical and optical properties of cut persimmon. **Journal of Food Engineering**, v. 86, n. 3, p. 315–323, 2008.

INSTITUTO INTERNACIONAL DEL FRÍO. **Alimentos Congelados**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1990.

JAFAROGHLI, M. et al. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 96, n. 1, p. 58–63, 2011.

JAMES, S. J.; JAMES, C. Chilling and Freezing of Foods. In: CLARK, S.; JUNG, C.; LAMSAL, B. (Eds.). **Food Processing: Principles and Applications: Second Edition**. 2 ed ed. [s.l.] Johan Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 79–105.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2005.

KANG, J. W.; KANG, D. H. Enhanced antimicrobial effect of organic acid washing against foodborne pathogens on broccoli by vacuum impregnation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 85–93, 2016.

KOSHIMOTO, C.; MAZUR, P. The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. **Cryobiology**, v. 45, n. 1, p. 80–90, 2002.

LEE, Y. A. et al. Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 4, p. 1165–1175.e5, 2014.

LI, L. F.; LIANG, X. X. The influence of adsorption orientation on the statistical mechanics model of type I antifreeze protein: The coverage rate. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v. 421, p. 355–359, 2015.

LIDE, D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition, 2003-2004. **Handbook of Chemistry and Physics**, v. 53, p. 2616, 2003.

LIN, C.; ZHANG, T.; RAWSON, D. M. Cryopreservation of zebrafish (danio rerio) blastomeres by controlled slow cooling. **Cryo-Letters**, v. 30, n. 2, p. 132–141, 2009.

MALO, C. et al. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 17–21, 2010.

MARCUSSI, B. A. **Desidratação Osmótica e Impregnação a Vácuo de Pêra (variedade Buerre D’Anjou)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

MICHAILIDIS, P. A., KROKIDA, M. K., RAHMAN, M. S. **Food Properties Handbook**. 2. ed. Nova York: CRC Press, 2009.

MINOLTA, K. **Precise Colour Communication: Colour control from perception to instrumentation**. Osaka: Minolta, 2003.

MISRAN, A. Evaluation of Post Harvest Technologies for Improving Strawberry Fruit Quality. p. 1–133, 2013.

MITCHELL, H. **Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology**. 2. ed. New Delhi: [s.n.].

MORENO, J. et al. Effect of blanching / osmotic dehydration combined methods on quality and stability of minimally processed strawberries. **Food Research International**, v. 33, 2000.

MORENO, J. et al. Osmotic Dehydration and Vacuum Impregnation on Physicochemical Properties of Chilean Papaya ( *Carica candamarcensis* ). **Journal of food science**, v. 69, n. 3, p. FEP102-FEP106, 2004.

MORENO, J. et al. Influence of ohmic heating and vacuum impregnation on the osmotic dehydration kinetics and microstructure of pears (cv. Packham's Triumph). **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 621–627, 2011.

MORENO, J. et al. Effect of ohmic heating and vacuum impregnation on the osmodehydration kinetics and microstructure of strawberries (cv. Camarosa). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 148–154, 2012.

MORRELL, J. M.; HODGES, J. K. Cryopreservation of non-human primate sperm: Priorities for future research. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1–4, p. 43–63, 1998.

MOTTA, J. P. R. et al. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 343–348, 2014.

MÚJICA-PAZ, H. et al. Impregnation and osmotic dehydration of some fruits: Effect of the vacuum pressure and syrup concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 57, n. 4, p. 305–314, 2003.

MÜLLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. **Plant Science**, v. 112, n. 1, p. 1–9, 1995.

NAING, S. W. et al. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1–2, p. 23–28, 2010.

NERI, L. et al. Use of vacuum impregnation for the production of high quality fresh-like apple products. **Journal of Food Engineering**, v. 179, p. 98–108, 2016.

NIST. **NIST: National Institute of Standards and Technology**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=99-20-7> %0A%0A>.

OCCHINO, E. et al. Effect of Vacuum Impregnation Treatments to Improve Quality and Texture of Zucchini (Cucurbita Pepo, L). **Procedia Food Science**, v. 1, n. Vi, p. 829–835, 2011.

**Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 3. ed. Washington: AOAC International, 1997.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos - Ordonez Vol. 1.pdf**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAES, S. S. **Estudo da Impregnação a Vácuo de Maçãs (Var. Gala)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

PALIYATH, G.; SUBRAMANIAN, J. Phospholipase D inhibition technology for enhancing shelf life and quality. **Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetable and Flowerx**, v. 1, p. 195–239, 2008.

PANARESE, V. et al. Vacuum impregnation modulates the metabolic activity of spinach leaves. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 26, p. 286–



293, 2014.

PASSOS, F. A. **Influência de Alguns Sistemas de Cultivo na Cultura do Morango (*Fragaria x ananassa* Duch)**. [s.l.: s.n.].

PATIST, A.; ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 40, n. 2, p. 107–113, 2005.

PEREZ-CABRERA, L. et al. Effectiveness of antibrowning agents applied by vacuum impregnation on minimally processed pear. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2273–2280, 2011.

PHOON, P. Y. et al. Pulsed electric field in combination with vacuum impregnation with trehalose improves the freezing tolerance of spinach leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 1, p. 144–148, 2008.

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. **Ciencia de los Alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1999.

PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fruit Ripening Phenomena- An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 1–19, 2007.

PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE MORANGO, P. & PIM. **Normas de Classificação de Morango**São PauloCEAGESP, , 2009.

PUTI, F. C. et al. Avaliação da qualidade pós-colheita de morangos embalados com embalagem com nanopartícula de prata. **Anais da VI Jornada Científica-Embapa São Carlos**, p. 88-, 2014.

QIN, X. et al. *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production. **Food Microbiology**, v. 63, p. 205–212, 2016.

RADZIEJEWSKA-KUBZDELA, E.; BIEGANSKA-MARECIK, R.; KIDON, M. Applicability of vacuum impregnation to modify physico-chemical, sensory and nutritive characteristics of plant origin products - A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16577–16610, 2014.

RAYOS, A A et al. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. **Journal of reproduction and fertility**, v. 100, n. 1, p. 123–129, 1994.

REISSER JR, C. et al. Panorama do Cultivo de Morangos no Brasil. **Campo&Negócio-Hortifruti**, 2014.

REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, L. E. C. Morangos: o cultivo no Brasil. **Campo&Negócio-Hortifruti**, v. 128, p. 44–47, 2016.

RENO, M.; PRADO, M.; RESENDE, J. Microstructural changes of frozen strawberries submitted to pre-treatments with additives and vacuum impregnation.

**Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 247–256, 2011.

RICHARDS, A. B. et al. Trehalose: A review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 871–898, 2002.

RODRIGUES, J. P. et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. **Cryobiology**, v. 56, n. 2, p. 144–151, 2008.

RODRIGUES, M. Z. **Impregnação a Vácuo de Micro-organismos Probióticos em Goiaba Minimamente Processada**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2013.

RONQUE, E. R. V. **Cultura do Morangueiro: revisão prática**. Curitiba: [s.n.].

SAITO, N. et al. *Theriogenology*. p. 1053–1060, 1994.

SANZANA, S.; GRAS, M. L.; VIDAL-BROTÓNS, D. Functional foods enriched in Aloe vera. Effects of vacuum impregnation and temperature on the respiration rate and the respiratory quotient of some vegetables. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1528–1533, 2011.

SCHMIDT, F. C.; CARCIOFI, B. A. M.; LAURINDO, J. B. Efeito da impregnação a vácuo na transferência de massa durante o processo de salga de cortes de peito de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 366–372, 2008.

SCHULZE, B. et al. The influence of vacuum impregnation on the fortification of apple parenchyma with quercetin derivatives in combination with pore structures X-ray analysis. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 380–387, 2012.

SINCONGEL- SINDICATO DA INDÚSTRIA ALIMENTAR DE CONGELADOS, SUPERCONGELADOS, SORVETES, C. E L. NO E. DE S. P. **No Dados Estatísticos do Setor no Brasil- 2014**. Disponível em: <<http://www.sicongel.org.br/vst/estatisticas.html>>.

SOMFAI, T. et al. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, n. 6, p. 571–579, 2015.

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1056–1065, 2004.

SZTEIN, J. M. et al. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 42, n. 1, p. 28–39, 2001.

TEIXEIRA, C. P. **Produção de Mudanças e Frutos de Morangueiro em Diferentes Sistemas de Cultivo**. [s.l.: s.n.].

TELESZKO, M.; NOWICKA, P.; WOJDYLO, A. Effect of cultivar and storage temperature on identification and stability of polyphenols in strawberry cloudy juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 54, p. 10–19, 2016.

TOBERGTE, D. R.; CURTIS, S. **O produtor pergunta, a Embrapa responde**. [s.l: s.n.]. v. 53

TONIETO, R. A. et al. Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 93, n. 2–3, p. 206–209, 2010.

TUDOR, V. et al. Analysis of Some Phenolic Compounds and Free Radical Scavenging Activity of Strawberry Fruits During Storage Period. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p. 157–164, 2015.

TUNCER, P. B. et al. Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1459–1465, 2011.

VARGAS, M. et al. Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 263–271, 2009.

VASANTHA RUPASINGHE, H. P. Optimization of Bioactive Fortification in Apple Snacks through Vacuum Impregnation Using Response Surface Methodology. **Food and Nutrition Sciences**, v. 1, n. 2, p. 45–52, 2010.

VELICKOVA, E. et al. Effect of vacuum infused cryoprotectants on the freezing tolerance of strawberry tissues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 146–150, 2013.

WICKLUND, T. et al. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 387–391, 2005.

WINGLER, A. The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 437–440, 2002.

XIE, J.; ZHAO, Y. Use of Vacuum Impregnation To Develop High Quality and Nutritionally Fortified Frozen Strawberries. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 28, n. 2, p. 117–132, 2004.

YANG, D. et al. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and a-glucosidase inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 194, p. 857–863, 2016.

YILDIZ, C. et al. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 579–585, 2000.

ZHAO, Y.; XIE, J. Practical applications of vacuum impregnation in fruit and vegetable processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 9, p. 434–451, 2004.



nos ensaios gerada em HPLC. O tempo de retenção da trealose é de 8,924 s, sendo este pico responsável por 97,58% do componente da amostra em base úmida.

Figura A.2- Cromatografia da análise de pureza da trealose em HPLC.

