

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Nutrição**  
**Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos**  
**Mestrado Acadêmico em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Conservação de morangos congelados enriquecidos com *Saccharomyces boulardii* utilizando revestimento à base de gelatina comercial**

Aluna: Kennia Mendes Prietsch

Pelotas, 29 de março de 2021.

**Kennia Mendes Prietsch**

**Conservação de morangos congelados enriquecidos com *Saccharomyces boulardii* utilizando revestimento à base de gelatina comercial**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Dellinghausen Borges

Co-orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Rosane Barboza Mendonça

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P948c Prietsch, Kennia Mendes

Conservação de morangos congelados enriquecidos com *Saccharomyces boulardii* utilizando revestimento à base de gelatina comercial / Kennia Mendes Prietsch ; Caroline Dellinghausen Borges, orientadora ; Carla Rosane Barboza Mendonça, Eliezer Avila Gandra, coorientadores. — Pelotas, 2021.

70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. *Fragaria x ananassa* duch. 2. Morango camarosa. 3. Revestimento comestível. 4. Alimento funcional. I. Borges, Caroline Dellinghausen, orient. II. Mendonça, Carla Rosane Barboza, coorient. III. Gandra, Eliezer Avila, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Kennia Mendes Prietsch

Conservação de morangos congelados enriquecidos com *Saccharomyces boulardii* utilizando revestimento à base de gelatina comercial

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 29 de março de 2021

Banca examinadora:

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Dellinghausen Borges (Orientadora). Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana Valesca Rodriguez Alicieo. Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Maringá.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizangela Gonçalves de Oliveira. Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Rosane Barboza Mendonça (Co-orientadora). Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (Co-orientador). Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
meu alicerce neste mundo.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradecer a meus pais Nei Francisco Prietsch e Vera Prietsch por todo apoio dado, são os principais envolvidos para a realização deste mestrado, vocês são os melhores pais deste universo.

Ao meu irmão Lucas Prietsch, por toda ajuda nos momentos de “perrengue” com *notebook* e risadas na madrugada.

À minha orientadora Caroline Borges pela paciência, apoio e conselhos. Caroline é a professora, das quais eu conheço, que mais se interessa pelos alunos, pela sua atuação como professora e orientadora. Se todos os professores fossem como ela autocríticos, sem ego e entendessem os alunos teríamos no Brasil a melhor educação do mundo.

Aos meus co-orientadores, Carla e Eliezer que são pessoas de coração grande, e ótimos professores e orientadores.

Aos colegas de estudos durante esta jornada, principalmente os que me ajudaram na Bioestatística na modalidade EAD: Letícia Ribeiro, João Luiz Gervásio e Jalusa. À minha estagiária Bruna a qual se tornou uma amiga e colega, no meu coração somos por iguais e estagiária é apenas um rótulo. Essas pessoas foram muito importantes nesta jornada, são pessoas as quais irei levar no meu coração para sempre devido ao carinho e parceria.

À Drª. Shanise Lisie Mello El Halal por realizar as análises de firmeza nos morangos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

E a Deus, por me fazer acreditar que mais uma vez eu consegui superar os meus limites.

Obrigada!

## Resumo

PRIETSCH, Kennia Mendes. **Conservação de morangos congelados enriquecidos com *Saccharomyces boulardii* utilizando revestimento à base de gelatina comercial.** Orientadora: Caroline Dellinghausen Borges. 2021. 70f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2021.

O congelamento é considerado uma das maneiras mais fáceis de preservar a qualidade dos alimentos, entretanto a preservação do morango por esta técnica é muito difícil de realizar, pois se verifica a alteração da cor do fruto; oxidação dos compostos fenólicos pela ação das polifenoloxidases, oxidação da vitamina C; além da perda de exsudado e de textura, devido ao dano provocado pelos cristais de gelo. Uma alternativa para minimizar tais efeitos é o uso de revestimentos comestíveis, que além de reduzirem a perda de exsudado e as reações de oxidação, podem ser utilizados como carreadores de compostos funcionais. Assim, objetiva-se com o estudo avaliar a conservação de morangos congelados utilizando a gelatina comercial como revestimento e carreadora da levedura probiótica, *Saccharomyces boulardii*. Os morangos foram selecionados, lavados e sanitizados em solução de hipoclorito de sódio (200 mg L<sup>-1</sup>), após foram submetidos aos distintos tratamentos: 1 - Controle 1 (morango armazenado a -18 °C); 2 - controle 2 (morango armazenado a -80 °C); 3 - morangos adicionados de ácido cítrico (1,0% p/v), cloreto de cálcio (1,0% p/v) e *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 armazenados a -18 °C; 4 - morangos adicionados de gelatina (5,0% p/v), ácido cítrico (1,0% p/v), cloreto de cálcio (1,0% p/v), glicerol (1,0% p/v) e *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 armazenados a -18 °C. Os morangos foram embalados em sacos de polietileno de alta densidade e armazenados durante 90 dias sob congelamento. Foram avaliados a perda de exsudado, sólidos solúveis, pH, acidez titulável, cor, firmeza, ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas, atividade antioxidante, atividade da polifenoloxidase e viabilidade da *Saccharomyces boulardii*. O uso do revestimento de gelatina em morangos minimizou os efeitos do congelamento e promoveu a proteção da *Saccharomyces boulardii*, obtendo-se até 60 dias de armazenamento a concentração mínima viável do microrganismo para exercer a propriedade funcional e redução da perda de exsudado. Além disso, o revestimento de gelatina, adicionado de ácido cítrico e cloreto de cálcio, em conjunto ao congelamento a -18 °C, reduziu as reações metabólicas e exerceu um efeito de proteção aos compostos bioativos, sendo possível a sua utilização em substituição ao ultracongelamento. Por outro lado, na ausência da gelatina a *Saccharomyces boulardii* influenciou negativamente nos parâmetros físico-químicos, além de mostrar menor viabilidade.

**Palavras-chave:** *Fragaria x ananassa* Duch. Morango Camarosa. Revestimento comestível. Alimento funcional.

## Abstract

PRIETSCH, Kennia Mendes. **Preservation of frozen strawberries enriched with *Saccharomyces boulardii* using commercial gelatin-based coating.** Advisor: Caroline Dellinghausen Borges. 2021. 70f. Master Degree (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Freezing is considered one of the easiest ways to preserve the quality of food, however the preservation of strawberries by this technique is very difficult to perform, due to the loss of anthocyanins; oxidation of phenolic compounds by the action of polyphenoloxidase, oxidation of vitamin C; in addition to the loss of exudate and texture due to the damage caused by the ice crystals. An alternative to minimize such effects is the use of edible coatings, which in addition to reducing the loss of exudate and oxidation reactions, can be used as carriers of functional compounds. Thus, the objective of the study is to evaluate the conservation of frozen strawberries using commercial gelatin as a coating and carrier of the probiotic yeast, *Saccharomyces boulardii*. The strawberries were selected, washed and sanitized in sodium hypochlorite solution ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), after which they were submitted to the different treatments: 1 - Control 1 (strawberry stored at  $-18^\circ\text{C}$ ); 2 - control 2 (strawberry stored at  $-80^\circ\text{C}$ ); 3 - strawberries added with citric acid (1.0% w / v), calcium chloride (1.0% w /v) and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 stored at  $-18^\circ\text{C}$ ; 4 - strawberries with gelatin (5.0% w/v), citric acid (1.0% w/v), calcium chloride (1.0% w/v), glycerol (1.0% w/v) ) and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 stored at  $-18^\circ\text{C}$ . The strawberries were packed in high density polyethylene bags and stored for 90 days under freezing. Loss of exudate, soluble solids, pH, titratable acidity, color, firmness, ascorbic acid, total phenolic compounds, monomeric anthocyanins, antioxidant activity, polyphenoloxidase activity and viability of *Saccharomyces boulardii* were evaluated. The use of gelatin coating on strawberries minimized the effects of freezing and promoted the protection of *Saccharomyces boulardii*, obtaining up to 60 days of storage the minimum viable concentration of the microorganism to exercise the functional property and reduce the loss of exudate. In addition, the gelatin coating added with citric acid and calcium chloride together with freezing at  $-18^\circ\text{C}$  reduced metabolic reactions and exerted a protective effect on bioactive compounds, making it possible to use them instead of deep freezing. On the other hand, in the absence of gelatin, *Saccharomyces boulardii* had a negative influence on the physical-chemical parameters, in addition to showing less viability.

**Key words:** *Fragaria x ananassa* Duch. Camarosa strawberry. Edible coating. Functional food.

## Lista de figuras

Figura 1	Morango da cultivar Camarosa.....	20
Figura 2	Interação cálcio-pectina.....	26
Figura 3	Perda de exsudado (%) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a –18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a –80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.....	35
Figura 4	Acidez titulável (% de ácido cítrico) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a –18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a –80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.....	37
Figura 5	Sólidos solúveis (°Brix) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a –18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a –80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.....	39
Figura 6	Vitamina C (mg.100g <sup>-1</sup> ) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a –18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a –80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.....	40
Figura 7	Compostos fenólicos totais (mg equivalente a ácido gálico.100g <sup>-1</sup> ) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a –18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a –80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e <i>Saccharomyces boulardii</i> , armazenados a –18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.....	42

- Figura 8 Antocianinas monoméricas (mg de perlagonidina-3-glucosideo equivalente.100g<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%..... 44
- Figura 9 Atividade antioxidante (% de inibição) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%..... 46
- Figura 10 Cor (L\*) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%..... 47
- Figura 11 Cor (a\*) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%..... 48
- Figura 12 Cor (b\*) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%..... 49
- Figura 13 Atividade da polifenoloxidase (UAE.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%..... 50

Figura 14 Firmeza (N) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%..... 52

Figura 15 Viabilidade da *Saccharomyces boulardii*, expressa através da contagem de fungos ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ), em morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%. 53

### **Lista de tabelas**

Tabela 1	Delineamento experimental para avaliação da conservação de morangos submetidos ao congelamento.....	29
----------	--	----

## Sumário

1. Introdução .....	14
2. Objetivos .....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3. Hipótese .....	18
4. Revisão bibliográfica .....	19
4.1 Morango .....	19
4.2 Congelamento .....	21
4.2.1 Efeitos dos pré-tratamentos aplicados a morangos submetidos ao congelamento.....	22
4.3 Revestimentos comestíveis como carreadores de agentes de firmeza, agentes antioxidantes e probióticos .....	24
5. Material e métodos.....	28
5.3.1 Perda exsudado .....	30
5.3.2 Acidez titulável .....	30
5.3.3 Vitamina C.....	30
5.3.4 Sólidos solúveis.....	30
5.3.5 Firmeza .....	31
5.3.6 Cor.....	31
5.3.7 Preparo do extrato hidroalcoólico.....	31
5.3.8 Compostos fenólicos totais.....	31
5.3.9 Antocianinas monoméricas .....	32
5.3.10 Atividade antioxidant.....	32
5.3.11 Atividade enzimática.....	33
5.3.12 Contagem de <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	33
5.3.13 Análise estatística .....	34
6. Resultados e discussão.....	35
6.1 Perda de exsudado .....	35
6.2 Acidez titulável .....	37
6.3 Sólidos solúveis.....	38
6.4 Vitamina C.....	40
6.5 Compostos fenólicos totais.....	41
6.6 Antocianinas monoméricas .....	43

6.7 Atividade antioxidante .....	45
6.8 Cor .....	46
6.9 Polifenoloxidase .....	50
6.10 Firmeza .....	51
6.12 Viabilidade da <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	52
7. Conclusão .....	55
Referências .....	56
Apêndices.....	66

## 1. Introdução

As frutas vermelhas como morango, framboesa, amora e mirtilo apresentam grande aceitação pelo seu sabor, aparência e aroma, mas também pela presença dominante de compostos fenólicos, os quais estão diretamente associados a diversas atividades funcionais e, principalmente à prevenção de doenças crônicas (AABY et al., 2012).

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertencente à família Rosaceae, está entre as frutas vermelhas mais consumidas no mundo por apresentar aroma e gosto agradáveis e textura suculenta, além disso, é considerado uma boa fonte de folato e potássio, e uma ótima fonte de fibra alimentar, vitamina C, manganês e substâncias antioxidantes como fitoquímicos (CEREZO et al., 2010; GARCIA et al., 1996).

O morango é não climatérico, entretanto, apresenta alta perecibilidade, podendo apenas ser estocado por pequenos períodos (BRON, 2007). Assim, técnicas de preservação eficazes são necessárias para prolongar a vida útil do morango, a fim de manter suas propriedades físicas e nutricionais. O congelamento é uma das técnicas de preservação de alimentos mais comuns e bem estabelecidas, que diminui a taxa de deterioração, reduzindo a mobilidade molecular, as atividades microbianas, enzimáticas, oxidativas e a taxa respiratória (BILBAO-SAINZ et al., 2019).

Ainda que o congelamento seja considerado uma das maneiras mais fáceis de preservar a qualidade dos alimentos, a preservação do morango por congelamento traz consequências danosas, pois se verifica a alteração da coloração do fruto, em função da perda de antocianinas, oxidação dos compostos fenólicos pela polifenoloxidase e da oxidação da vitamina C, além da perda de exsudado e de textura, devido ao dano provocado pelos cristais de gelo (ABD-ELHADY, 2014; BERBARI et al., 1998; BULUT et al., 2018; RENO et al., 2011).

Assim, diferentes pré-tratamentos têm sido avaliados com o intuito de manter as características do morango submetido ao congelamento, como imersão em sacarose, cloreto de cálcio, pectina associada à aplicação de calor (BERBARI et al., 1998); sacarose e cloreto de cálcio (SUUTARINEN et al., 2000);

revestimento de quitosana adicionado de lactato de cálcio/gluconato de cálcio e vitamina E (HAN et al., 2004); infusão a vácuo de cloreto de cálcio e da enzima pectinametilesterase (BUGGENHOUT et al., 2006); pré-tratamento à base de ácido ascórbico, sacarose e pectina de baixo teor de metoxilação (OSZMIAŃSKI et al., 2009); imersão de morangos em soluções de pectimetilesterase e cloreto de cálcio (GALETTTO et al., 2010); impregnação a vácuo de cloreto de cálcio, pectina e glicose (RENO et al., 2011); imersão em ácido cítrico e lactato de cálcio associado ao resfriamento a 5 °C *overnight* (ABD-ELHADY, 2014) e tratamento com suco de limão, ácido ascórbico, sacarose, cloreto de cálcio, alginato e pectina de baixo teor de metoxilação (YU; LIAO, 2016).

De modo geral, os trabalhos utilizam um agente de firmeza (cloreto de cálcio, lactato de cálcio ou gluconato de cálcio) e um agente antioxidante (ácido cítrico ou ácido ascórbico), sendo principalmente utilizados como revestimento carboidratos, como sacarose, glicose e pectina; poucos são os trabalhos que avaliaram a utilização de outros polissacarídeos, como quitosana e alginato. Os revestimentos influenciam, principalmente, na redução da perda por exsudação em função do controle na formação dos cristais de gelo e de reações de oxidação (BERBARI et al., 2008; HAN et al., 2004; OSZMIAŃSKI et al., 2009).

A gelatina é uma proteína de origem animal obtida do colágeno por hidrólise ácida ou básica, e amplamente utilizada na indústria alimentícia (FAKHOURI et al., 2007). Como revestimento, tem apresentado bons resultados na conservação de vegetais *in natura* e minimamente processados (AITBOULAHSEN et al., 2018; LICODIEDOFF et al., 2016; MANNUCCI et al., 2017; RADÍ et al., 2017). Entretanto, trabalhos com a utilização de gelatina em vegetais submetidos ao congelamento são escassos.

Alimentos funcionais são aqueles que contêm ingredientes que trazem benefícios específicos para a saúde (ANNUNZIATA; VECCHIO; 2013). Como é o caso dos alimentos adicionados de probióticos. Microrganismos probióticos têm sido adicionados em vegetais minimamente processados (OLIVEIRA et al., 2014; RÖßLE et al., 2010; RUSSO et al., 2014; SHIGEMATSU et al., 2018; SPERANZA et al., 2018), porém em vegetais congelados, não foram encontrados relatos na literatura. *Saccharomyces boulardii* é um microrganismo probiótico que atua na regulação das bactérias intestinais, interferindo na capacidade de patógenos de colonizar e infectar a mucosa, na modulação das

respostas imunológicas, na estabilização da barreira gastrointestinal, na inibição de enzimas pró-carcinogênicas e na indução da atividade enzimática, que promove a absorção de nutrientes (VANDENPLAS et al., 2009).

A partir do que foi reportado, acredita-se que a conservação de morangos por congelamento com uso de gelatina e probiótico pode ser vantajosa para ampliar a vida útil e conferir características funcionais aos frutos para consumo *in natura*.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Avaliar a conservação de morangos Camarosa congelados adicionados de revestimento à base de gelatina comercial e carreador da levedura probiótica, *Saccharomyces boulardii*.

### **2.2 Específicos**

Avaliar parâmetros físicos como perda de líquidos por exsudação, firmeza e coloração da fruta;

Determinar parâmetros físico-químicos dos morangos como sólidos solúveis, teor de ácido ascórbico, acidez titulável, atividade da polifenoloxidase, compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas e atividade antioxidante;

Avaliar a viabilidade da *Saccharomyces boulardii* nas condições de congelamento utilizada.

### **3. Hipótese**

O revestimento de gelatina adicionado de cloreto de cálcio e ácido cítrico promove a manutenção das características físico-químicas do morango, assim como exerce ação protetora a *Saccharomyces boulardii* durante o armazenamento sob congelamento a -18 °C.

#### 4. Revisão bibliográfica

##### 4.1 Morango

O morangueiro é uma planta perene, rasteira e herbácea, que pertence à família Rosacea e ao gênero *Fragaria* (GOMES, 2007). O morango é um pseudofruto, pois é originado de uma única flor com vários ovários. O desenvolvimento de cada ovário produz uma fruta. Cada um dos pequenos pontos escuros do morango, chamado popularmente de semente, é cientificamente conhecido como aquênio, que na verdade é o verdadeiro fruto. A porção suculenta do morango origina-se do receptáculo floral, assim como se dá na maçã e na pera, em que o fruto verdadeiro é a parte central endurecida que contém as sementes (PEREIRA et al., 2011).

A cultura do morango está presente em todas as regiões do Brasil. Em 2017 foram produzidas no Brasil 146.477 toneladas de morango, sendo o Sudeste (110.337 toneladas) e o Sul (28.622 toneladas), as regiões que concentraram os maiores valores de produção, seguidas da região Centro-Oeste com 4.650 toneladas e Nordeste com 2.867 toneladas (IBGE, 2019).

Na região de Pelotas foram produzidas em 2018, 2.024 toneladas da fruta (EMATER, 2019).

No Brasil, o padrão varietal concentra-se em um número reduzido de cultivares, sendo Oso Grande na região Sudeste, e Camarosa, Aromas e Albion na região Sul.

A cultivar Camarosa foi lançada comercialmente em 1992 pela Universidade da Califórnia e caracteriza-se como uma cultivar de dias curtos. É uma planta vigorosa, com folhas grandes e coloração verde-escura. Apresenta ciclo precoce e com alta capacidade de produção. As frutas apresentam tamanho grande, com formato piramidal, podendo também ocorrer frutas com formato do tipo leque (Figura 1), apresentam epiderme vermelho-escura brilhante, uniforme e polpa de textura firme, com sabor subácido, próprio para consumo *in natura* e para a industrialização. A colheita concentra-se entre os meses de agosto e dezembro na região de Pelotas, RS (ANTUNES et al., 2016).



**Figura 1:** Morango da cultivar Camarosa, a fruta da esquerda com formato piramidal e os demais em formato de leque.

Fonte: ANTUNES et al., 2016.

O morango é apreciado por sua cor característica, sabor e aroma. Apresenta alto teor de umidade (90%), é rico em vitamina C (63,6 mg.100g<sup>-1</sup>) e boa fonte de fibras dietéticas (1,7 g.100g<sup>-1</sup>), folato (0,027 mg.100g<sup>-1</sup>), potássio (184 mg.100g<sup>-1</sup>) e outros compostos antioxidantes, como flavonoides e outros fenólicos. Adicionalmente é pobre em caloria (ANTUNES et al., 2016; PRASANNA et al., 2007; ROBARDS et al., 1999; TACO, 2011).

Segundo Severo (2009), o morango Camarosa em maturação 5 (ideal para consumo), apresenta teores de antocianinas totais de 23,42 mg cianidina 3 glicosídeo.100g<sup>-1</sup>, capacidade antioxidante de 2,24 µmol TE.g<sup>-1</sup> e fenóis totais de 752,04 mg GAE.100g<sup>-1</sup>. Já em relação aos fenóis individuais foram observados 206,29 mg.100g<sup>-1</sup> de ácido gálico, 113,69 mg.100g<sup>-1</sup> de ácido hidroxibenzoico, 4,58 mg.100g<sup>-1</sup> de ácido cumárico, 3,45 mg.100g<sup>-1</sup> de ácido ferúlico, 0,62 mg.100g<sup>-1</sup> de ácido cafeico, 3,05 mg.100g<sup>-1</sup> de catequina, 1,68 mg.100g<sup>-1</sup> de epicatequina, 0,29 mg.100g<sup>-1</sup> de queracetina e 3,6 mg.100g<sup>-1</sup> de kaempferol.

As características do morango estão relacionadas à presença de flavonoides (antocianinas, flavonóis), ácidos fenólicos e vitamina C. Esses compostos apresentam atividade anticarcinogênica e anti-inflamatória. Atuam por meio da remoção de radicais livres, o que limita a formação dessas substâncias e neutraliza o estresse oxidativo. Podem reduzir o risco de doenças degenerativas, obesidade, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas e cânceres (NUNES; NOVELHO, 2020).

O morango é uma fruta não climatérica, assim deve ser colhida muito próximo à sua maturação para que suas características sensoriais se expressem de forma total, entretanto, apresenta alta perecibilidade na conservação pós-colheita, devido a sua intensa atividade metabólica e grande suscetibilidade ao

ataque de microrganismos deterioradores causadores de alterações microbiológicas, sendo as mais comuns as ocasionadas pelos fungos *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer* (CANTILLANO et al., 2010).

#### 4.2 Congelamento

O congelamento é uma forma de conservação de alimentos que ocorre com a redução da atividade de água, pois parte da água presente no alimento deixa de ser líquida, ocorrendo a formação de cristais de gelo (CARELLE et al., 2014).

O tamanho e a localização dos cristais de gelo formados nos tecidos dependem da velocidade de congelamento. O congelamento rápido proporciona a formação de cristais de gelo muito pequenos e intracelulares, que não provocam o rompimento das células, com isso a textura do alimento é mantida. Além disso, reduz a difusão dos sais e a separação da água na forma de gelo, impedindo a formação de soluções hipertônicas no produto. No congelamento lento, ocorre o contrário, uma vez que há a formação de grandes cristais de gelo, os quais rompem as células e desorganizam a estrutura do alimento (OETTERER et al., 2006). Quando os alimentos congelados pelo método lento são descongelados, os tecidos desidratados não se reidratam, com isso a textura do alimento fica comprometida (CAMPELL-PLATT, 2015)

Em função da taxa de congelamento, os métodos são classificados em: congelamento lento ( $0,2 \text{ cm.h}^{-1}$ ), congelamento rápido ( $0,5 \text{ a } 3 \text{ cm.h}^{-1}$ ), congelamento muito rápido ( $5 \text{ a } 10 \text{ cm.h}^{-1}$ ) e congelamento ultra-rápido ( $10 \text{ a } 100 \text{ cm.h}^{-1}$ ) (FELLOWS, 2006).

Entretanto, apesar dos benefícios do congelamento rápido, essa tecnologia não é viável para muitas agroindústrias, em função do custo inicial para a aquisição do equipamento.

Dependendo do alimento, o congelamento não constitui um método de redução microbiana, pois atinge somente uma parte da microbiota. Em relação a atividade enzimática há somente redução desta (OETTERER et al., 2006). O congelamento ocasiona a desnaturação e precipitação de proteínas e enzimas, reduzindo assim a população de alguns microrganismos e ocasionando a redução da atividade enzimática. Os cristais de gelo formados também podem

afetar a viabilidade microbiana, principalmente, de células bacterianas bastonetes Gram negativos, os quais provocam o rompimento da membrana citoplasmática que é mais sensível que as Gram positivas. De uma forma geral, o congelamento afeta pouco o valor nutricional dos alimentos (SILVA, 2000).

A manutenção da qualidade das frutas na pós-colheita e o prolongamento da vida útil, estão diretamente relacionados com os tratamentos adicionais realizados nessa fase (ANTUNES et al., 2016).

A utilização de baixas temperaturas é essencial para o armazenamento, transporte a longas distâncias e comercialização de morangos. Entretanto, para o seu armazenamento prolongado apenas a redução da temperatura não é suficiente para manter a qualidade das frutas, sendo necessário usar também outras técnicas que visam prolongar a vida útil das frutas na pós-colheita (CHITARRA; CHITARRA 1990).

Apesar dos morangos serem um dos produtos agrícolas mais sensíveis à degradação no congelamento, existe uma grande demanda de morangos congelados (DELGADO; RUBIOLO, 2005), principalmente para a indústria de doces. Há pouca disponibilidade de morango congelado no mercado varejista.

Entretanto, em morangos congelados, verifica-se alteração da coloração do fruto, em função da perda de antocianinas, oxidação dos compostos fenólicos pela polifenoloxidase e da vitamina C, além da perda de exsudado e de textura, devido ao dano provocado pelos cristais de gelo (ABD-ELHADY, 2014; BERBARI et al., 1998; BULUT et al., 2018; RENO et al., 2011).

#### 4.2.1 Efeitos dos pré-tratamentos aplicados a morangos submetidos ao congelamento

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de manter as características dos morangos submetidos ao congelamento. Berbari et al. (1998) observaram que o revestimento de morangos com 0,5% de pectina e 0,2% de cloreto de cálcio utilizado como pré-tratamento ao congelamento a -25 °C, diminuiu a perda de líquido por exsudação, assim como reduziu as perdas de ácido ascórbico, não interferindo no sabor e na cor do produto.

Pré-tratamentos constituídos pela imersão ou aspersão de sacarose e cloreto de cálcio a morangos submetidos ao congelamento a -20 °C e

armazenamento por 2 meses foram avaliados por Suutarinen et al. (2000). Os tratamentos não afetaram a perda por exsudação, entretanto, de forma geral tornaram a textura mais firme.

Han et al. (2004) demonstraram que o revestimento à base de quitosana, gluconato de cálcio/lactato de cálcio e vitamina E aplicado a morangos submetidos ao congelamento a -23 °C por 6 meses, reduziu a perda por exsudação e melhorou a textura.

Sacarose, pectina de baixo teor de metoxilação e ácido ascórbico ocasionaram proteção dos compostos fenólicos de morangos submetidos ao congelamento a -20 °C por 6 meses, principalmente para antocianinas, proantocianinas e beta-catequina, em relação aos flavonóis e ácidos fenólicos, sendo também observado influência da variedade do morango (OSZMIAŃSKI et al., 2009).

O efeito da imersão de morangos em soluções de pectimetaesterase e de cloreto de cálcio previamente ao congelamento (-22 °C) e armazenamento por 55 dias foi avaliado por Galetto et al. (2010). Os resultados demonstraram que a firmeza dos frutos descongelados diminuiu aproximadamente 74% em relação aos morangos frescos, e nenhum dos tratamentos avaliados proporcionou benefício significativo na manutenção da firmeza. No entanto, o congelamento por imersão em cloreto de cálcio proporcionou um benefício significativo na redução da perda por exsudação dos morangos descongelados.

Reno et al. (2011) avaliaram um pré-tratamento ao congelamento (-18 °C) de morangos, constituído da impregnação a vácuo de diferentes concentrações de cloreto de cálcio, pectina e glicose. A concentração de pectina teve influência e demonstrou potencial para a proteção do tecido de amostras congeladas. As fotomicrografias mostraram que a perda de fluido celular ocorreu durante o crescimento do gelo formado nos espaços intercelulares, sendo retardada em tratamentos com altas concentrações de pectina.

No estudo de Abd-Elhady (2014), a imersão dos morangos em 0,4% de ácido cítrico associado a 1% de lactato de cálcio, previamente ao congelamento a -40 °C, com posterior armazenamento a -18 °C por 12 meses, resultou em menor perda por exsudação e aumento da firmeza, retenção de ácido ascórbico e antocianinas.

Yu e Liao (2016) avaliaram o uso de pré-tratamentos com suco de limão, ácido ascórbico, sacarose, cloreto de cálcio, alginato e pectina de baixo teor de metoxilação em morangos submetidos ao congelamento criomecânico (nitrogênio líquido e ar forçado -25 °C) e *air blast* (ar forçado -25 °C) e armazenamento a -18 °C de 6 meses, dependendo do experimento. De acordo com seus resultados, o pré-tratamento com suco de limão combinado ao tratamento com alginato e cloreto de cálcio mostrou-se eficaz na minimização de instabilidade de cor e textura dos morangos, independentemente do método de congelamento.

#### 4.3 Revestimentos comestíveis como carreadores de agentes de firmeza, agentes antioxidantes e probióticos

Uma técnica de preservação que vem sendo utilizada para vegetais é a aplicação de revestimentos comestíveis. Esses se caracterizam como uma dispersão que é aplicada diretamente sobre a superfície do alimento e logo após a secagem, formam uma fina película sobre o produto (VILLADIEGO et al., 2005). A aplicação do revestimento pode ser realizada de duas formas: por meio de imersão rápida do fruto em uma solução filmogênica ou por meio de aspersão, cujo processo é semelhante, porém a solução é aspergida sobre o alimento (BESINELA JUNIOR et al., 2010).

Com a aplicação do revestimento nos vegetais tem-se a formação de uma cobertura com preenchimento parcial dos estômatos e lenticelas, o que reduz a transferência de umidade e as trocas gasosas (ASSIS et al., 2009).

De acordo com Oetterer et al. (2006), os revestimentos coloidais protegem contra os danos do frio, diminuem a cristalização e retêm a fase líquida no interior da célula. Sendo úteis quando a velocidade de congelamento é lenta, entretanto, seu emprego pode ser prejudicial durante o congelamento rápido, pois servem como núcleos para a cristalização intracelular (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O revestimento não tem como objetivo substituir o emprego de materiais convencionais de embalagens, além disso, ele deve apresentar certas características como ter aderência suficiente para não ser facilmente removido no manuseio, ser invisível e não introduzir alterações no gosto ou odores originais (ASSIS et al., 2009).

De acordo com a composição, os revestimentos são classificados em três categorias: hidrocoloidais, são à base de polissacarídeos ou proteínas, apresentam baixa permeabilidade ao oxigênio, dióxido de carbono e lipídeos; lipídicos, são compostos orgânicos, os quais por sua natureza hidrofóbica, apresentam baixa permeabilidade ao vapor de água; compostos, são à base de proteínas e lipídeos, ou polissacarídeos e lipídeos (VILLADIEGO et al., 2005).

Em morangos congelados tem-se avaliado como revestimento comestível, principalmente carboidratos como sacarose, glicose, pectina, quitosana e alginato. Os revestimentos influenciam, principalmente, na redução da perda por exsudação em função do controle na formação dos cristais de gelo e de reações de oxidação (BERBARI et al., 2008; HAN et al., 2004; OSZMIAŃSKI et al., 2009).

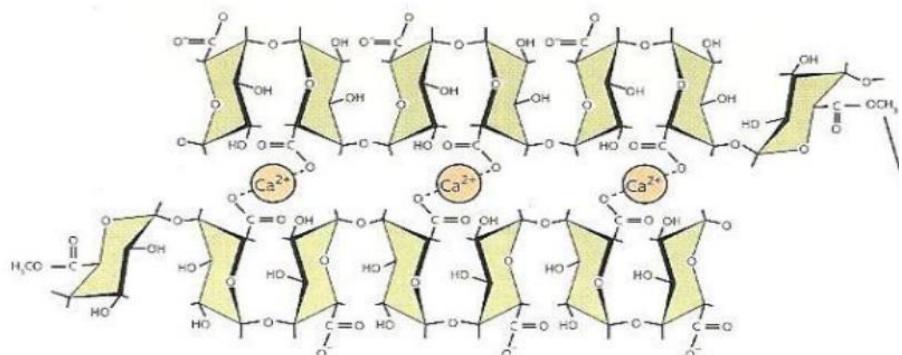
A gelatina é uma proteína de origem animal obtida do colágeno por hidrólise ácida ou básica, e amplamente utilizada na indústria alimentícia (FAKHOURI et al., 2007). Como revestimento, tem apresentado bons resultados na conservação de vegetais *in natura* e minimamente processados (AITBOULAHSEN et al., 2018; LICODIEDOFF et al., 2016; MANNUCCI et al., 2017; RADÍ et al., 2017). Entretanto, trabalhos com a utilização de gelatina em vegetais submetidos ao congelamento não foram encontrados. Porém, a gelatina tem sido avaliada como crioprotetora no congelamento de microrganismos (HUBÁLEK, 2003).

Os revestimentos têm sido também utilizados como carreadores de agentes de firmeza, antioxidantes, conservantes, entre outros. De modo geral, os trabalhos com morangos congelados utilizam um agente de firmeza (cloreto de cálcio, lactato de cálcio ou gluconato de cálcio) e um agente antioxidante (ácido cítrico ou ácido ascórbico) (BERBARI et al., 2008; HAN et al., 2004; OSZMIANSKI et al., 2009).

O ácido cítrico tem sido aplicado como antioxidante para controlar a oxidação dos compostos fenólicos pela enzima polifenoloxidase e com isso o escurecimento enzimático em função de reduzir o pH e inativar a enzima (KOBLITZ, 2008).

Os sais de cálcio, quando aplicados na pós-colheita dos frutos, atuam na preservação da firmeza. O cálcio ao ligar-se covalentemente às pectinas dá origem ao pectato de cálcio, que restringe a ação da pectinametilesterase e

poligalacturonase, retardando o amaciamento e assim, mantendo a firmeza do fruto (YAMAMOTO et al., 2011).



**Figura 2:** Interação cálcio-pectina.

Fonte: TAIZ; ZEIGER, 2004.

Frequentemente, plastificantes como o glicerol e sorbitol são usados no revestimento comestível, com o intuito de conferir mais plasticidade e para melhorar a adesão deste ao vegetal. As moléculas do plastificante diminuem as forças intermoleculares facilitando o movimento das cadeias do revestimento (ASSIS; BRITTO, 2014).

Diferentes espécies probióticas de *Lactobacillus* têm sido adicionados a revestimentos comestíveis em vegetais minimamente processados (OLIVEIRA et al., 2014; RÖßLE et al., 2010; RUSSO et al., 2014; SHIGEMATSU et al., 2018; SPERANZA et al., 2018), porém em vegetais congelados, não foram encontrados trabalhos que reportassem essa aplicação. Entretanto, nos primeiros testes experimentais realizados pelo nosso grupo de pesquisa, essa espécie apresentou baixa viabilidade em condições de congelamento, diferentemente da *Saccharomyces boulardii*.

Para a levedura *Saccharomyces boulardii* o congelamento representa um estresse, sem causar uma severa diminuição na viabilidade celular, isso significa que a sobrevivência deste microrganismo é relativamente alta (PARDO et al., 2009).

Alimentos funcionais são aqueles que contêm ingredientes que trazem benefícios específicos para a saúde (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2013). Como é o caso dos alimentos adicionados de probióticos. Esses são microrganismos

vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO; WHO, 2001).

A *Saccharomyces boulardii* foi isolada na Indochina, a partir da fruta tropical lichia, usada pelos nativos para tratar a diarreia, é uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce na temperatura de 37 °C), resistente à ação do suco gástrico, das secreções entérica e pancreática e da bile, assim como à ação de antibióticos e quimioterápicos (LOPES; PINTO, 2010). É um microrganismo probiótico, pois atua na regulação das bactérias intestinais, na interferência da capacidade dos patógenos de colonizar e infectar a mucosa, na modulação das respostas imunológicas, na estabilização da barreira gastrointestinal, na inibição de enzimas pró-carcinogênicas e na indução da atividade enzimática que promove a absorção de nutrientes (VANDENPLAS et al., 2009).

## 5. Material e métodos

### 5.1 Material

Os morangos (*Fragaria x ananassa* Duch.) da cultivar Camarosa foram utilizados como matéria-prima do estudo, sendo adquiridos em outubro de 2019, de um produtor do distrito de Cerrito Alegre na cidade de Pelotas/RS (latitude: -31.776, longitude: -52.3594, 31° 46' 34" Sul, 52° 21' 34" Oeste).

### 5.2 Métodos

Os morangos foram selecionados quanto à ausência de defeitos fisiológicos, tamanho e cor (>75% da superfície de coloração vermelha). Após foram lavados com água e sanitizados em solução de hipoclorito de sódio 200 mg L<sup>-1</sup>, pH entre 6,5 e 7,0, por 15 min. Os morangos foram utilizados inteiros e com sépala e pedicelo.

Os seguintes tratamentos foram avaliados: Tratamento 1: Controle 1 (morango armazenado a -18 °C); Tratamento 2: controle 2 (morango armazenado a -80 °C); Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico (1,0% p/v), cloreto de cálcio (1,0% p/v) e *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (2,2 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina (5,0% p/v), ácido cítrico (1,0% p/v), cloreto de cálcio (1,0% p/v), glicerol (1,0% p/v) e *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (2,2 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>) armazenados a -18 °C.

No tratamento 1 os morangos foram armazenados em freezer a -18 °C (Consul, Brasil), já no tratamento 2, os morangos foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C (Coldlab, Brasil).

Nos tratamentos 3 e 4 foi utilizado um cultivo lyophilizado da levedura *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 contendo aroma de tutti-frutti, estearato de magnésio, frutose e lactose (Merck, França), na concentração de 2,2 x 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, adicionado na solução do revestimento. Além desse, foram adicionados ácido cítrico (1,0% p/v) e cloreto de cálcio (1,0% p/v), sob agitação por 10 min à temperatura ambiente.

No tratamento 4 também foi empregada gelatina incolor e sem sabor (Royal, Brasil), a qual foi preparada por dissolução em água destilada na concentração de 5% (p/v). A solução foi homogeneizada em agitador magnético à 60 °C por 30 min. Após a dissolução foram adicionados o microrganismo liofilizado, o cloreto de cálcio, o ácido cítrico e o glicerol, sob agitação por 10 min à temperatura ambiente.

Para os tratamentos 3 e 4, os frutos foram totalmente submersos nas soluções por 30 s e secos sob ventilação forçada à temperatura ambiente (15 °C).

Os morangos foram embalados em sacos de polietileno de alta densidade, padronizando o número de frutos por embalagem (200 g) e armazenados a –18 °C ou –80 °C conforme tratamento, durante 90 dias.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4 x 4, sendo 4 tratamentos (1, 2, 3 e 4) e 4 períodos de avaliação (0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento). As avaliações foram realizadas nos morangos descongelados a 4 °C por 16 h, realizadas no mínimo em triplicata.

A Tabela 1 apresenta o delineamento experimental realizado.

**Tabela 1.** Delineamento experimental para avaliação da conservação de morangos submetidos ao congelamento.

Tratamento	Variáveis independentes*		Variáveis dependentes
		Tempo (dias)	
1	0 30 60 90		Perda de exsudado
			Sólidos solúveis
			Acidez titulável
			Cor
2	0 30 60 90		Firmeza
			Ácido ascórbico
			Compostos fenólicos totais
			Antocianinas monoméricas
3	0 30 60 90		Atividade antioxidante
			Atividade da polifenoloxidase
			Viabilidade da <i>Saccharomyces boulardii</i>
4	0 30 60 90		

\*4 tratamentos x 4 períodos de avaliação x 11 variáveis dependentes x 3 repetições.

n = 528 avaliações.

### **5.3 Avaliações**

#### **5.3.1 Perda exsudado**

A perda de exsudado (PE) foi determinada através da diferença de peso antes e após o descongelamento dos morangos (HAN et al., 2004). A perda de líquido foi calculada em porcentagem, conforme a equação 1:

$$PE(\%) = \frac{Peso\ da\ amostra\ fresca - Peso\ da\ amostra\ descongelada}{Peso\ da\ amostra\ fresca} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

#### **5.3.2 Acidez titulável**

A acidez titulável foi determinada por titulação potenciométrica de 10 g de amostra triturada e homogeneizada com 100 mL de água destilada. A amostra foi titulada utilizando-se solução de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> até uma faixa de pH (8,2-8,4). Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico (IAL, 2008).

#### **5.3.3 Vitamina C**

Vinte gramas de morangos triturados foram misturados com 50 mL de água, 10 mL de solução de ácido sulfúrico a 20% (v/v), 1 mL da solução de iodeto de potássio a 10% (v/v) e 1 mL da solução de amido a 1% (p/v), sendo a titulação realizada com solução de iodato de potássio 0,002 mol.L<sup>-1</sup> até coloração rosada. Os resultados foram expressos em mg.100 g<sup>-1</sup> de amostra (IAL, 2008).

#### **5.3.4 Sólidos solúveis**

Os sólidos solúveis foram determinados em refratômetro de bancada do tipo Abbé, a 20 °C (IAL, 2008).

### **5.3.5 Firmeza**

As medidas de firmeza dos morangos foram determinadas utilizando-se o texturômetro (Stable Micro Systems TA.XTplus, Reino Unido). Foi utilizado o probe P-2N. O teste realizado foi de compressão para medir a firmeza ou força para ocasionar a ruptura do fruto. Os parâmetros operacionais utilizados foram: velocidade de pré-teste de  $1,0 \text{ mm.s}^{-1}$ , velocidade de teste de  $1,00 \text{ mm.s}^{-1}$ , velocidade pós-teste de  $10,00 \text{ mm.s}^{-1}$ , força de acionamento de 0,245 N. A firmeza obtida foi automaticamente registrada mediante o *software Texture Exponent 32*. A leitura foi realizada na região central equatorial do morango, sendo os resultados expressos em Newton (N).

### **5.3.6 Cor**

A cor foi determinada utilizando-se um colorímetro (Minolta CR 400, Japão). No padrão  $C.I.E L^*a^*b^*$ , onde a coordenada  $L^*$  expressa o grau de luminosidade da cor medida ( $L^* = 100$  = branco;  $L^* = 0$  = preto), a coordenada  $a^*$  expressa o grau de variação entre o vermelho (+60) e o verde (-60) e a coordenada  $b^*$  expressa o grau de variação entre o azul (-60) e o amarelo (+60).

### **5.3.7 Preparo do extrato hidroalcoólico**

Para o preparo do extrato hidroalcoólico os morangos foram triturados e 5 g destes foram adicionados de 50 mL de solução metanólica (70% metanol/30% de água). O extrato ficou 3 h sob agitação a temperatura ambiente, após foi submetido à filtração em papel qualitativo.

### **5.3.8 Compostos fenólicos totais**

A determinação dos compostos fenólicos totais seguiu a metodologia proposta por Singleton et al. (1999) com algumas modificações. Alíquotas de 1 mL do extrato hidroalcoólico (70% metanol/30% água) foram adicionadas de 1 mL de solução Folin-Ciocalteau e, posteriormente, 8 mL de água destilada. Após 3 min de reação, 1 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mol. $\text{L}^{-1}$  foi adicionado e a mistura incubada

a 37 °C por 30 min. A absorbância da solução resultante foi medida em espectrofotômetro (AAKER, Brasil) a 750 nm. A quantificação foi realizada utilizando a curva de calibração realizada com o ácido gálico nas concentrações de 0 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg EAG.100g<sup>-1</sup> de morangos.

### 5.3.9 Antocianinas monoméricas

O conteúdo de antocianinas monoméricas foi determinado pelo método do pH diferencial (LEE et al., 2005). Para isso, 1 mL do extrato foi adicionado de 4 mL de tampão cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 mol.L<sup>-1</sup>) e em outra porção de amostra adicionada de 4 mL de tampão de acetato de sódio pH 4,5 (0,4 mol.L<sup>-1</sup>). Após 20 min com a amostra no escuro foi realizada leitura em espectrofotômetro (AAKER, Brasil), nos comprimentos de onda de 520 nm e 700 nm. Os resultados foram calculados conforme as equações 2 e 3 e os resultados expressos em mg eq. pelargonidina-3-glicosídeo por 100 g (base úmida).

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH_1} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH_{4,5}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Antocianinas(mg.100g}^{-1}) = \frac{(AxPMxFDx1000)}{(\varepsilon x 1)} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que, A = absorbância; PM = peso molecular da antocianina predominante na amostra, neste caso pelargonidina-3-glicosídeo (PM = 433 g.mol<sup>-1</sup>); FD = fator de diluição; 1000 = fator de conversão de g em mg; ε = absorvidade molar 22.400 para pelargonidina-3-glucosídeo; 1 = caminho óptico percorrido (largura da cubeta).

### 5.3.10 Atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada seguindo o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) de acordo com Brand-Willians et al. (1995).

Foram utilizados 750 µL do extrato hidroalcoólico (70% metanol/30% água) em 3750 µL de DPPH (0,05 mM), a leitura realizada após 20 min, em espectrofotômetro (AAKER, Brasil), a 515 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.

### 5.3.11 Atividade enzimática

Para a extração das enzimas, 1 g do tecido congelado foi homogeneizado com 10 mL de tampão fosfato 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7, contendo 1% de polivinilpirrolidona e imediatamente filtrado. O homogenato obtido foi centrifugado por 15 min a 7.000 g e temperatura de 3 °C (MATSUNO; URITANI, 1972). O sobrenadante resultante foi utilizado para a determinação da atividade da enzima polifenoloxidase.

Na determinação da atividade da enzima polifenoloxidase, 1 mL de extrato enzimático foi adicionado a 3,6 mL de tampão fosfato 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 6 e 0,1 mL de catecol 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. A solução obtida foi incubada durante 30 min a 30 °C, após imediatamente resfriado em banho de gelo e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (AAKER, Brasil), no comprimento de onda de 395 nm. A atividade enzimática da polifenoloxidase foi expressa em unidade (atividade enzimática capaz de alterar 0,001 de absorbância a 395 nm) por grama de polpa fresca por minuto (UAE.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

### 5.3.12 Contagem de *Saccharomyces boulardii*

A contagem das leveduras foi realizada de acordo com os procedimentos propostos por Downes e Ito (2001). Para todas as amostras foram realizadas diluições seriadas em solução salina estéril (0,85%) até a diluição 10<sup>-9</sup> para a quantificação das leveduras na solução de revestimento e até 10<sup>-7</sup> para a contagem nos morangos submetidos aos tratamentos 1, 2, 3 e 4, as análises foram realizadas em duplicata.

Para a contagem da *Saccharomyces boulardii*, expressa através da contagem de fungos, foi utilizado o método de plaqueamento em Ágar Batata Dextrose, sendo as placas incubadas a 25 °C. Foram realizadas contagens aos três e aos cinco dias de incubação. O resultado foi expresso em log UFC.g<sup>-1</sup>.

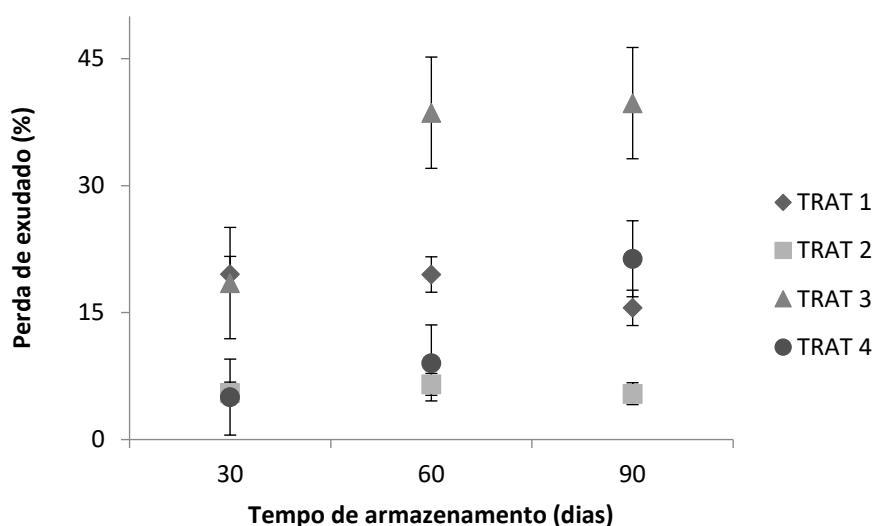
### **5.3.13 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e a comparação de médias entre os tratamentos foi realizada pelo Teste de *Tukey* com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa STATISTIX 10. Para a avaliação do tempo de armazenamento foi calculado o intervalo de confiança a 95%.

## 6. Resultados e discussão

### 6.1 Perda de exsudado

Pode-se observar na Figura 3, que houve manutenção ( $p \geq 0,05$ ) nos valores de perda de exsudado dos morangos submetidos aos tratamentos 1 e 2, porém nos tratamentos 3 e 4 houve aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) dos valores durante o armazenamento.



**Figura 3:** Perda de exsudado (%) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Ao se avaliar a influência do tratamento, observa-se que em 30 dias de armazenamento, os morangos submetidos aos tratamentos 2 e 4 apresentaram significativamente os menores valores de perda de exsudado em relação aos demais tratamentos, sem distinção significativa entre eles (Apêndice A). Em 60 dias, os valores de exsudado dos morangos oriundos dos tratamentos 2 e 4, ainda foram os menores em relação aos demais ( $p \leq 0,05$ ), já no tratamento 3 obteve-se significativamente os maiores valores ( $p \leq 0,05$ ). Porém, em 90 dias de armazenamento, a perda de exsudado no tratamento 2 não diferiu do tratamento 1, sendo nestes obtidos os menores valores. Já no tratamento 3 observou-se significativamente as maiores perdas de exsudado dos morangos, em relação aos demais tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

A perda de fluido celular é um importante parâmetro de qualidade de congelamento que pode estar relacionado ao grau de ruptura da estrutura celular. A maior perda de fluido celular indica um maior dano aos tecidos (RENO et al., 2011).

Os morangos congelados a -80 °C (tratamento 2) apresentaram durante todo o período de armazenamento baixos valores de perda de exsudado, pois o congelamento rápido proporciona a formação de pequenos cristais de gelo intracelulares, que não provocam o rompimento das células, reduzindo a perda de exsudado. Por outro lado, no congelamento lento (tratamento 1), há a formação de grandes cristais de gelo, os quais rompem as células ocasionando maior perda de exsudado (BULLUT et al., 2018; OETTERER et al., 2006).

Assim, parece que o revestimento de gelatina (tratamento 4) foi eficiente em reduzir a perda de exsudado até 60 dias de armazenamento congelado. Reno et al. (2011) demonstraram que revestimentos a base de pectina, cloreto de cálcio e glicose reduziram a perda por exsudação em função do controle na formação dos cristais de gelo. De acordo com Han et al. (2004), o revestimento ajuda a reter o líquido exsudado e evita a migração de umidade da fruta para o meio ambiente durante o processo de congelamento e descongelamento. Após 60 dias, a perda de exsudados no tratamento 4 aumentou significativamente, inclusive sendo superior ao tratamento 1, possivelmente em função da degradação da gelatina por proteases produzidas pela levedura.

A adição da levedura probiótica sem a presença da gelatina (tratamento 3) influenciou negativamente nos resultados, visto que houve aumento na perda de exsudado, até mesmo em relação ao tratamento 1. Tal fato pode ser justificado em função da levedura *Saccharomyces boulardii* produzir distintas enzimas (IM; POTHOUAKIS, 2010).

Não ficou clara a influência dos demais compostos adicionados nos tratamentos 3 e 4 (ácido cítrico e cloreto de cálcio) nos resultados.

Diferentes estudos têm demonstrado a influência de revestimentos à base de soluções de açúcares e/ou polímeros associados a agentes de firmeza na manutenção da integridade da estrutura celular, por reduzir a cristalização e reforçar a parede celular pela formação de pectato de cálcio, respectivamente (HAN et al., 2004; RENO et al., 2011).

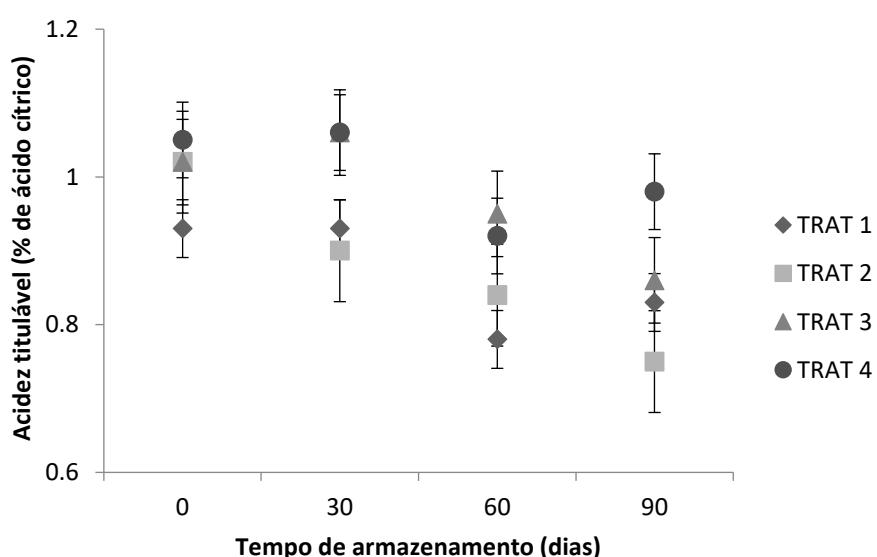
Han et al (2004) observaram que revestimentos de quitosana aplicados em morangos submetidos ao congelamento  $-23^{\circ}\text{C}$ , por 6 meses, reduziram a perda de exsudados, no mínimo em 24%.

De acordo com Abd-Elhady (2014), o aumento na concentração de lactato de cálcio de 0,5 a 1,5% no revestimento composto também por 0,4% de ácido cítrico, ocasionou a redução da perda de exsudados de morangos congelados a  $-40^{\circ}\text{C}$  e mantidos a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por 12 meses.

No estudo realizado por Yu e Liao (2016), houve redução na perda de exsudado de morangos congelados por dois métodos (criogênico e *air blast*) e posteriormente mantidos a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por 6 meses, em função da presença de revestimento com suco de limão, alginato e cloreto de cálcio.

## 6.2 Acidez titulável

Ao analisar os dados de acidez dos morangos congelados em relação ao tempo, pode-se observar redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) dos valores ao longo do armazenamento, para os tratamentos 1, 2 e 3. Já no tratamento 4, a redução dos valores, não foi significativa ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 4). Cabe ressaltar que os morangos submetidos aos tratamentos 3 e 4 foram adicionados de ácido cítrico, assim percebe-se que o revestimento de gelatina no tratamento 4 reduziu o processo de amadurecimento dos frutos.



**Figura 4:** Acidez titulável (% de ácido cítrico) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e

*Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Ao término do armazenamento de 90 dias, pode-se verificar que os morangos submetidos ao tratamento 4 apresentaram percentual de acidez significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superior aos morangos submetidos ao congelamento a -80 °C (tratamento 2), o que demonstra que o revestimento de gelatina aliado ao congelamento a -18 °C foram mais efetivos na manutenção dos valores em relação ao congelamento em ultrafreezer. Entretanto, não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos valores da acidez dos morangos submetidos aos tratamentos 1, 3 e 4, assim como, entre os tratamentos 1, 2 e 3 (Apêndice B).

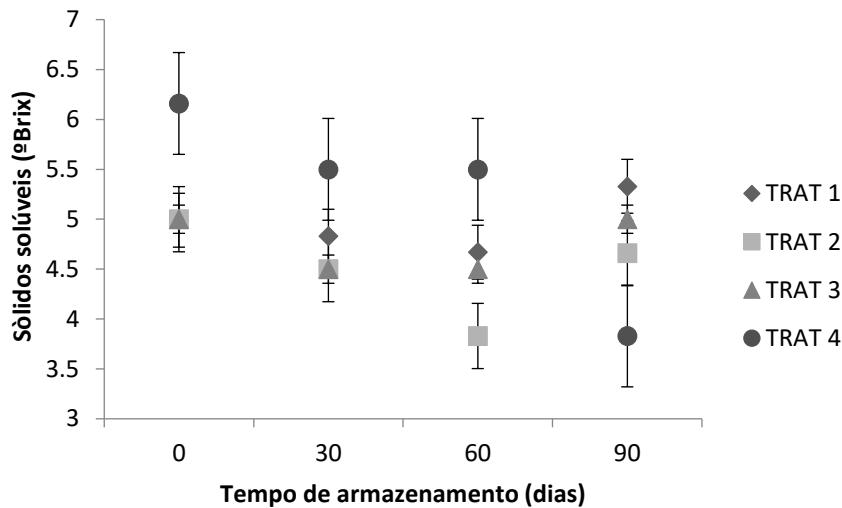
A diminuição dos teores de acidez, provavelmente, está relacionada com a oxidação dos ácidos orgânicos e conversão destes em açúcares (KAYS, 1991; MATTIUZ et al., 2003).

Han et al. (2004) observaram a redução da acidez de morangos congelados sem revestimento e revestidos com quitosana, ácido acético, Tween 80 e glicerol, assim como naqueles tratamentos adicionados de lactato de cálcio/gluconato de cálcio ou vitamina E, armazenados a -23 °C por 6 meses. Assim como neste estudo, os morangos revestidos apresentaram menor mudança nos valores, possivelmente em função da camada semipermeável do revestimento na superfície do fruto que pode ter modificado a atmosfera interna, retardando o amadurecimento.

Por outro lado, Yu e Liao (2016) não observaram variação nos valores de acidez durante 6 meses de armazenamento dos morangos congelados controle e aqueles revestidos com suco de limão, alginato e cloreto de cálcio, utilizando congelamento criomecânico (nitrogênio líquido e ar forçado -5 °C) e *air blast* (ar forçado -25 °C) e armazenamento a -18 °C.

### 6.3 Sólidos solúveis

Pode-se observar que houve tendência de redução dos sólidos solúveis dos morangos congelados até 60 dias, independente do tratamento (Figura 5). Porém, após esse período, para os tratamentos 1, 2 e 3 houve aumento significativos ( $p \leq 0,05$ ) dos valores, já no tratamento 4 observou-se redução ( $p \leq 0,05$ ) no teor de sólidos solúveis.



**Figura 5:** Sólidos solúveis (%Brix) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Em relação à influência do tratamento nos diferentes tempos de armazenamento (Apêndice C), percebe-se que os valores de sólidos solúveis dos morangos submetidos ao tratamento 4 foram significativamente superiores aos demais ( $p \leq 0,05$ ) no ponto 0. Em 30 e 60 dias de armazenamento, os valores dos sólidos solúveis dos morangos submetidos ao tratamento 4 foram superiores àqueles obtidos nos tratamentos 2 e 3 ( $p \leq 0,05$ ), porém não se diferenciaram do tratamento 1 ( $p \leq 0,05$ ). Já em 90 dias, obteve-se os menores valores de sólidos solúveis nos morangos do tratamento 4, não havendo distinção daqueles submetidos ao tratamento 2.

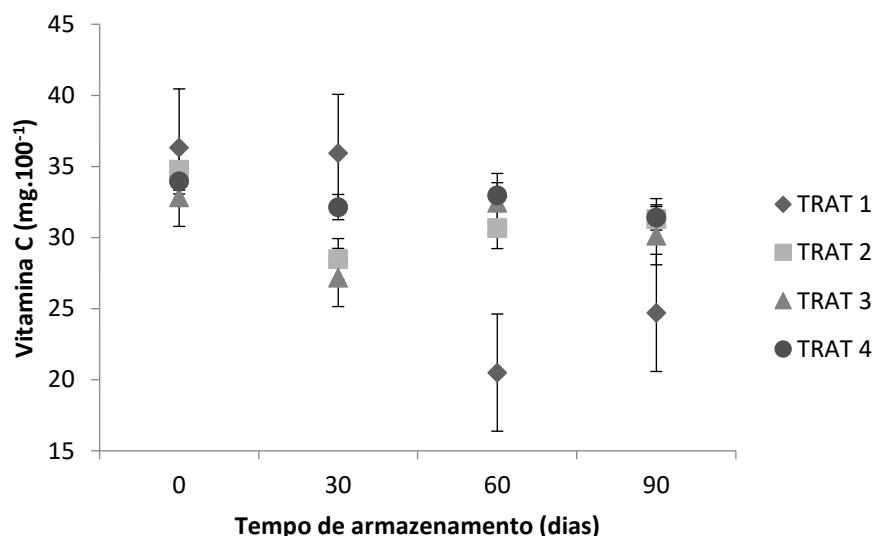
A redução no teor de sólidos solúveis durante o armazenamento pode estar relacionada ao processo de respiração do fruto (KOBELITZ, 2008), por mais que as temperaturas de congelamento reduzam o ritmo deste processo (OETTERER et al., 2006). Já o aumento no teor desses pode ter ocorrido em função do processo de amadurecimento em que há conversão do amido e dos ácidos em glicose (KOBELITZ, 2008). Assim, sugere-se que o revestimento de gelatina no tratamento 4 tenha reduzido o processo de maturação dos morangos, até em relação ao emprego do ultracongelamento no tratamento 2.

Já o maior teor de sólidos solúveis observados inicialmente no tratamento 4, pode ser em função da presença da gelatina, diferentemente do que se observou no tratamento 3, cujos valores não se alteraram.

Reno et al. (2011) observaram que a impregnação de pectina, glicose e cloreto de cálcio em morangos submetidos ao congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ , ocasionou o aumento no teor de sólidos solúveis. Já Yu e Liao (2016) não observaram alteração significativa no conteúdo de sólidos solúveis durante o armazenamento de morangos congelados por 6 meses, tanto da amostra controle quanto daqueles revestidos com suco de limão, alginato e cloreto de cálcio, utilizando congelamento criomecânico (nitrogênio líquido e ar forçado  $-25^{\circ}\text{C}$ ) e *air blast* (ar forçado  $-25^{\circ}\text{C}$ ) e armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.4 Vitamina C

Ao analisar os dados de vitamina C de morangos congelados em relação ao tempo, pode-se observar que houve diminuição significativa ( $p\leq 0,05$ ) dos valores ao longo do armazenamento, nos tratamentos 1 e 2, conforme Figura 6. No tratamento 3 houve redução significativa em 30 dias com posterior aumento. Já no tratamento 4 houve manutenção dos valores ( $p\geq 0,05$ ) em 90 dias de armazenamento.



**Figura 6:** Vitamina C ( $\text{mg.}100\text{g}^{-1}$ ) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de

gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Ao término do armazenamento (Apêndice D), os morangos submetidos ao tratamento 1 apresentaram o menor teor de vitamina C ( $p \leq 0,05$ ). Não se verificou diferença nos valores entre os tratamentos 2, 3 e 4.

A vitamina C é muito sensível à degradação devido à sua oxidação (TURMANIDZE et al., 2017). Possivelmente a presença do ácido cítrico nos tratamentos 3 e 4 tenha influenciado na obtenção de valores superiores de vitamina C, em relação ao tratamento 1.

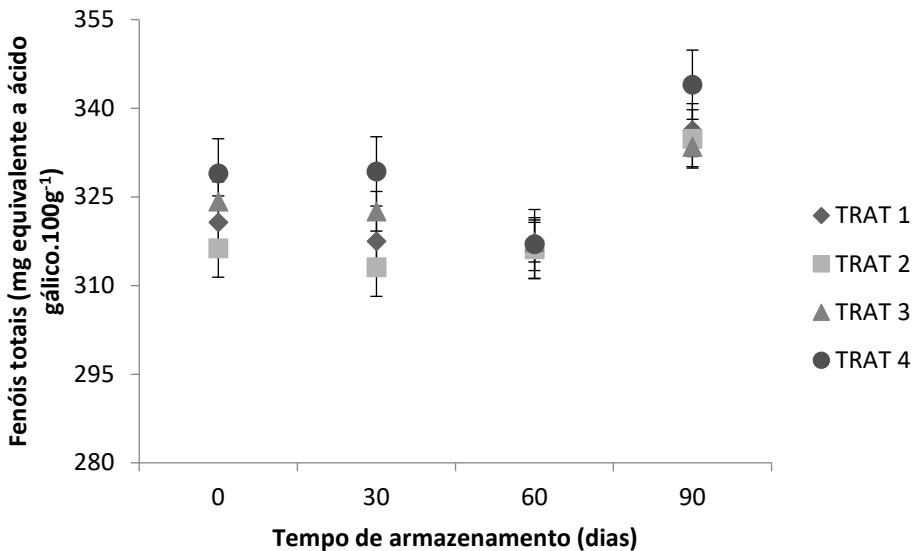
Yu e Liao (2016) observaram redução do teor de vitamina C de morangos submetidos a dois métodos de congelamento (criogênico e *air blast*) e posteriormente congelados a -18 °C. Não foi verificada influência do revestimento à base suco de limão, alginato e cloreto de cálcio nos valores.

Já no estudo de Bulut et al. (2018), houve aumento no teor de vitamina C de morangos congelados a -27 °C na primeira semana de armazenamento, possivelmente segundo os autores, em função da maior extração da vitamina após o congelamento e descongelamento, em função da lesão ocasionada pelos cristais de gelo na parede celular. Entretanto, ao término do armazenamento (14 semanas) houve redução dos valores.

De acordo com Abd-Elhady (2014), o aumento de lactato de cálcio (0,5-1,5%) utilizado juntamente de 0,4% de ácido cítrico, ocasionou o aumento no teor de ácido ascórbico de morangos congelados a -40 °C e mantidos a -18 °C, possivelmente por influenciar na firmeza dos frutos.

## 6.5 Compostos fenólicos totais

Não houve variação significativa ( $p \geq 0,05$ ) do teor de compostos fenólicos totais dos morangos congelados até os 60 dias de armazenamento, independente do tratamento (Figura 7). Porém, a partir dos 60 dias houve aumento do teor de compostos fenólicos totais ( $p \leq 0,05$ ), em todos os tratamentos.



**Figura 7:** Compostos fenólicos totais (mg equivalente a ácido gálico.100g<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Ao avaliar a influência do tratamento nos diferentes tempos de armazenamento (Apêndice E), percebe-se que houve tendência dos morangos submetidos ao tratamento 4 apresentarem os maiores valores, entretanto com distinção significativa ( $p \leq 0,05$ ) dos demais tratamentos somente em 30 e 90 dias. Em relação aos demais tratamentos, observou-se valores semelhantes sem distinção significativa entre eles, nos tempos 0, 60 e 90.

A tendência de aumento no teor dos compostos fenólicos durante o armazenamento tem sido justificada na literatura em função do dano causado na parede e membrana celular pelo congelamento, resultando na maior extração dos compostos fenólicos (BULLUT et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2015).

Bullut et al. (2018) também observaram oscilação com tendência de aumento no teor de compostos fenólicos totais de morangos submetidos ao congelamento a -27 °C por 90 dias, sendo obtido ao término do armazenamento 226,09 mg EAG.100g<sup>-1</sup>.

Oliveira et al. (2015) avaliaram os compostos fenólicos individuais de morangos fatiados submetidos ao congelamento a -20 °C, por até 365 dias. No global, o armazenamento ocasionou redução dos compostos fenólicos, entretanto, o comportamento foi dependente do composto avaliado, por exemplo

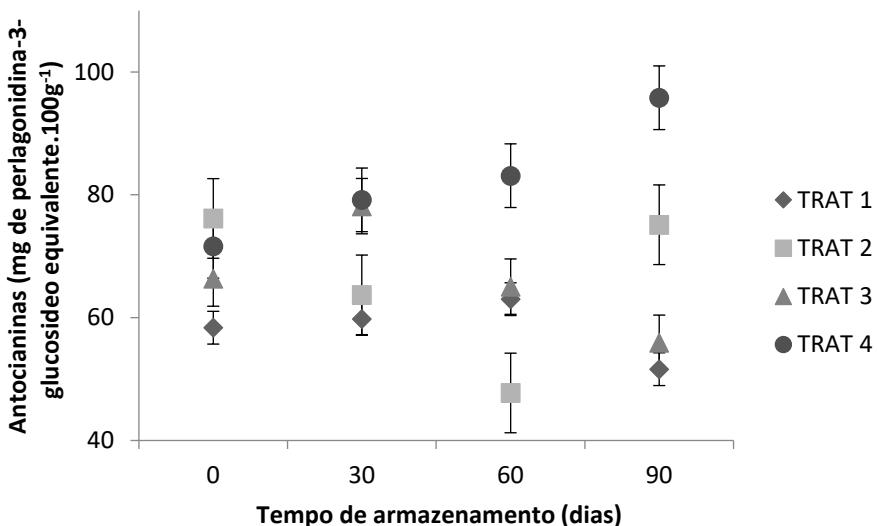
observou-se redução de (-) epicatequina e ácido elágico, porém aumento de (-) epigalocatequina galato e (+) catequina em relação aos morangos frescos.

Neste estudo obteve-se a maior concentração dos compostos fenólicos ao término do armazenamento no tratamento 4, porém não foi o tratamento com maior perda de exsudado, não sendo assim possível relacionar os resultados ao dano celular. Entretanto, sugere-se que a presença do revestimento comestível, o qual sela a fruta, tenha originado uma camada protetora contra a absorção de oxigênio o que reduz a oxidação enzimática dos compostos fenólicos (THOMAS et al., 2016).

No estudo realizado por Oszmiański et al. (2009) com morangos congelados a -20 °C por 6 meses, foi observado que os pré-tratamentos com açúcar, pectina ou ácido ascórbico exerceram efeito de proteção sobre os compostos fenólicos, mas especificamente sobre as antocianinas, proantocianinas e catequina, em relação aos flavonóis e ácidos fenólicos.

## 6.6 Antocianinas monoméricas

Distintos comportamentos foram observados no teor de antocianinas nos morangos ao longo do período de conservação por congelamento (Figura 8). No tratamento 1 houve manutenção dos valores até 60 dias ( $p \geq 0,05$ ), com posterior redução significativa ( $p \leq 0,05$ ). No tratamento 2 observou-se redução ( $p \leq 0,05$ ) em 60 dias, após houve aumento significativo dos valores. No tratamento 3 pode-se visualizar aumento em 30 dias, porém com redução dos valores em 60 dias ( $p \leq 0,05$ ). Já no tratamento 4, houve aumento significativo dos valores ( $p \leq 0,05$ ) em 90 dias de armazenamento.



**Figura 8:** Antocianinas monoméricas (mg de perlagonidina-3-glucosideo equivalente.100g<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

De uma forma geral, os morangos revestidos de gelatina (tratamento 4) apresentaram os maiores teores de antocianinas em relação aos demais tratamentos (Apêndice F), possivelmente em função do revestimento de gelatina que minimiza a presença do oxigênio e diminui a atividade da polifenoloxidase. Cabe ressaltar que no tratamento 3, com o uso do ácido cítrico e do cloreto de cálcio, sem a presença da gelatina, não se observou o mesmo efeito. Os morangos submetidos ao tratamento 1 apresentaram os menores teores de antocianinas possivelmente em função da maior atividade da enzima polifenoloxidase (Apêndice F).

Sabe-se que as antocianinas são estáveis em pH ácido (1-3), o aumento do pH leva a formação de uma pseudo-base e subsequente aumento leva a formação de chalcona, já em pH de 4-6 as antocianinas apresentam-se incolores (ABD-ELHADY, 2014). Assim, a redução da acidez dos morangos nos tratamentos 1, 2 e 3, pode ter contribuído para a redução no teor de antocianinas. Entretanto, a biossíntese de antocianinas segue uma complexa via enzimática (TANAKA et al., 2008), cuja atividade não é totalmente inibida sob temperatura de congelamento (OETTERER et al., 2006).

Sugere-se que a maior concentração de antocianinas observadas no tratamento 4 seja decorrente da presença do revestimento o qual atua como uma

barreira ao gás, modificando assim a atmosfera interna nas frutas (níveis mais elevados de CO<sub>2</sub> e baixos níveis de O<sub>2</sub>) o que, por sua vez, pode retardar as reações bioquímicas levando à síntese de antocianina (TZOUUMAKI et al., 2009).

A estabilidade das antocianinas é altamente variável dependendo da cultivar do morango, da estrutura e concentração das antocianinas, do pH, da temperatura de estocagem, entre outros (ABD-ELHADY, 2014; OLIVEIRA et al., 2014; OSZMIANSKI et al., 2009; SAHARI et al., 2004).

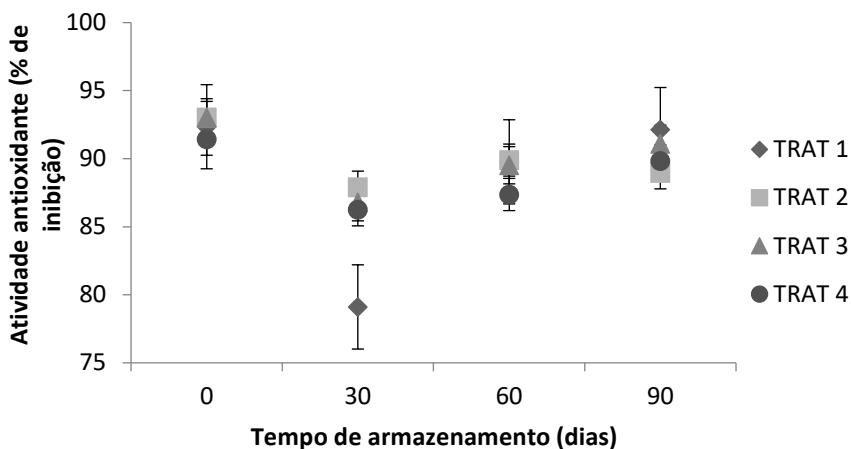
Foi demonstrado por Sahari et al. (2004) que o congelamento lento ( $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 h) e rápido de morangos ( $-50$  a  $-100^{\circ}\text{C}$  por 11 min), assim como a temperatura de conservação ( $-12^{\circ}\text{C}$ ,  $-18^{\circ}\text{C}$  e  $-24^{\circ}\text{C}$ ) por 90 dias, ocasiona alterações nos teores de antocianinas. Obteve-se no congelamento rápido menor teor de antocianinas, independente da temperatura de armazenamento.

Oliveira et al. (2015) avaliaram a concentração de antocianinas totais e individuais de morangos fatiados submetidos ao congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por até 365 dias. O armazenamento ocasionou uma redução de antocianinas, todavia, o comportamento é dependente do composto avaliado.

Dentre diferentes pré-tratamentos (açúcar, pectina ou ácido ascórbico) avaliados em morangos submetidos ao congelamento  $-20^{\circ}\text{C}$  por 6 meses, o ácido ascórbico permitiu maior retenção das antocianinas em relação aos tratamentos com pectina ou açúcar (OSZMIASKI et al., 2009). Já Abd-Elhady (2014) demonstrou que o aumento da concentração de ácido cítrico (0,2-0,6%), assim como de lactato de cálcio (0,5-1,5%), aumentou a preservação das antocianinas de morangos congelados a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 20 min com posterior armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 12 meses, em função da redução do pH e da perda de exsudados após o descongelamento, respectivamente.

## **6.7 Atividade antioxidante**

De acordo com a Figura 9, observa-se que nos T1, T3 e T4, houve redução significativa da atividade antioxidante dos morangos em 30 dias de armazenamento, com posterior incremento até 90 dias ( $p\leq 0,05$ ). Já no T2 houve redução dos valores em 30 dias ( $p\leq 0,05$ ), seguido de manutenção nos demais tempos de avaliação ( $p\geq 0,05$ ).



**Figura 9:** Atividade antioxidante (% de inibição) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Independente do tratamento, altos valores de atividade antioxidante foram observados. Ao término do armazenamento os maiores valores foram obtidos nos morangos submetidos aos tratamentos T1 e T3, seguido de T4 e T2 (Apêndice G).

O morango é rico em bioativos como os compostos fenólicos e a vitamina C, os quais estão relacionados com a atividade antioxidante da fruta (QUINATO et al., 2007; TURMANIDZE et al., 2017).

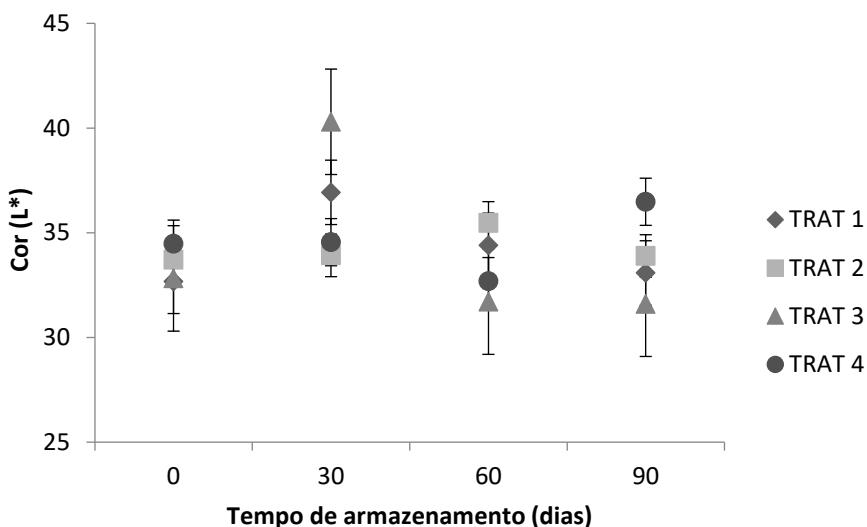
Bullut et al. (2018) observaram pequenas alterações na atividade antioxidante de morangos armazenados a  $-27^{\circ}\text{C}$  por 90 dias. De acordo com os autores, o aumento na atividade antioxidante é decorrente da ruptura celular causada pelo descongelamento da fruta antes da análise o que melhora a extração dos compostos fenólicos.

Já no estudo realizado por Oliveira et al. (2015), a atividade antioxidante de morangos submetidos ao congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 h não foi alterada, entretanto, o congelamento por 360 dias ocasionou a redução da atividade antioxidante em 20%.

## 6.8 Cor

De acordo com a Figura 10, pode-se observar que os valores da coordenada  $L^*$  dos morangos submetidos ao tratamento 1 e 3 aumentaram

significativamente em 30 dias de armazenamento, com posterior redução ( $p \leq 0,05$ ). Houve manutenção dos valores ( $p \geq 0,05$ ) nos morangos submetidos ao tratamento 2. Já no tratamento 4, observou-se redução dos valores em 60 dias, com posterior aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 10:** Cor ( $L^*$ ) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

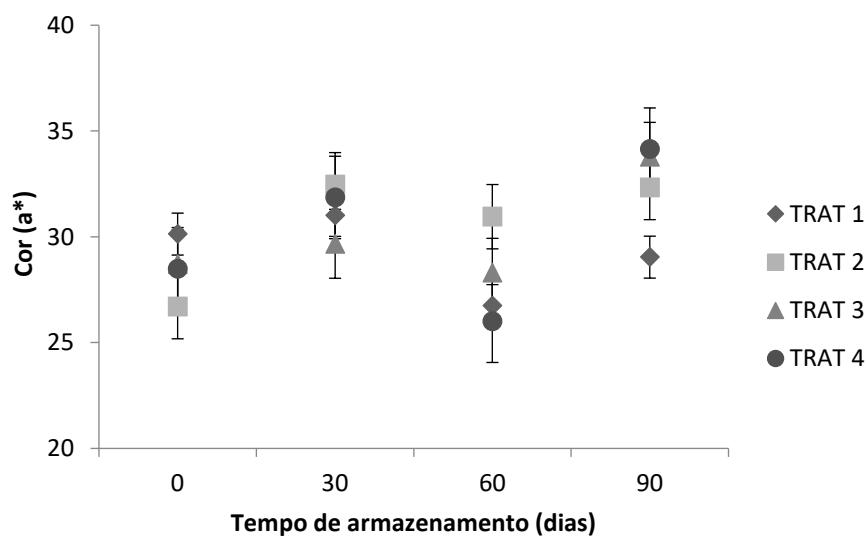
Porém, apesar dos distintos comportamentos em relação ao tempo, não se observou influência significativa dos tratamentos nos valores obtidos ( $p \leq 0,05$ ) (Apêndice H). Assim, não ficou evidente a influência da adição do ácido cítrico nos morangos submetidos aos tratamentos 3 e 4, nos valores de luminosidade.

Pereira (2019) ao avaliar a utilização de gelatina como revestimento de goiabas também não observou influência do revestimento nos valores de luminosidade.

Comportamento distinto em relação a presença de ácido cítrico e cálcio foi obtido por Abd-Elhady (2014), que observou maiores valores de luminosidade dos morangos controle congelados a  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  e mantidos a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  por 12 meses, em relação aos morangos tratados com ácido cítrico e/ou lactato de cálcio. De acordo com o autor, a cor mais clara pode ser atribuída à ocorrência de branqueamento.

Por outro lado, valores inferiores da coordenada L\* de morangos submetidos a congelamento criomecânico (nitrogênio líquido e ar forçado – 25 °C) e *air blast* (ar forçado – 25 °C) foram observados por Yu e Liao (2016), em relação às amostras pré-tratadas com suco de limão, alginato e cloreto de cálcio e congeladas nas mesmas condições das amostras controle. Segundo os autores, o ácido cítrico presente no suco de limão atua como um copigmento, minimizando a instabilidade das antocianinas.

Em relação a coordenada a\* (Figura 11), houve manutenção dos valores até 30 dias de armazenamento, com posterior redução ( $p \leq 0,05$ ) no tratamento 1. Observou-se aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) dos valores nos morangos submetidos ao tratamento 2 durante os 90 dias de armazenamento. No tratamento 3, os valores da coordenada a\* permaneceram constantes até 60 dias, com posterior aumento ( $p \leq 0,05$ ). Houve oscilação dos valores nos morangos submetidos ao tratamento 4, entretanto com incremento significativo ( $p \leq 0,05$ ) ao se comparar o primeiro e último dia de armazenamento.



**Figura 11:** Cor (a\*) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a –18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a –80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a –18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a –18 °C. As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

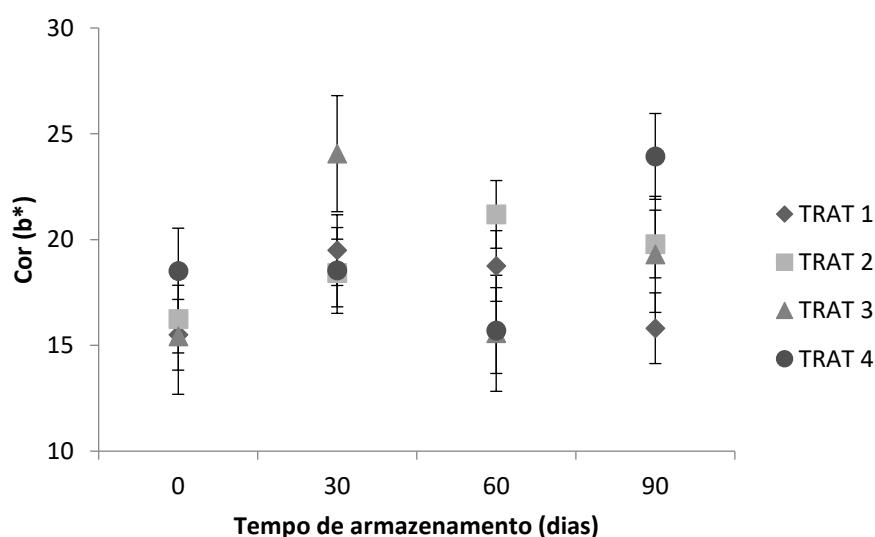
Ao se avaliar a influência do tratamento (Apêndice I), observa-se que não houve distinção entre as amostras até 60 dias, entretanto, ao término do armazenamento, os morangos revestidos com ácido cítrico e cloreto de cálcio (tratamentos 3 e 4) apresentaram valores superiores ( $p \leq 0,05$ ) na coordenada a\*

(coloração mais avermelhada), em relação ao tratamento 1. Os valores observados na coordenada  $a^*$  dos morangos submetidos ao tratamento 2, não diferiram significativamente daqueles oriundos dos tratamentos 1, 3 e 4.

Aumento nos valores da coordenada  $a^*$  de morangos armazenados por 3 meses a  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$  foram atribuídos por Bullut et al. (2018), à difusão do pigmento do centro da fruta para as camadas mais externas das células, devido à ruptura das paredes celulares.

Abd-Elhady (2014) também observou valores superiores (31%) na coordenada  $a^*$  de morangos congelados tratados com ácido cítrico (0,4%) e lactato de cálcio (0,5-1,5%), em relação aos morangos controle, pois o ácido cítrico inibe as reações de escurecimento e mantém o conteúdo de antocianina durante congelamento.

Distintos comportamentos em relação ao tempo foram observados nos valores da coordenada  $b^*$  dos morangos congelados (Figura 12). No tratamento 1 houve aumento dos valores em 30 dias, com posterior redução em 60 dias de armazenamento ( $p\leq 0,05$ ). Observou-se aumento significativo dos valores da coordenada  $b^*$  nos morangos do tratamento 2. Já no tratamento 3, houve aumento dos valores em 30 dias de armazenamento, com posterior redução em 60 dias ( $p\leq 0,05$ ). No tratamento 4 os valores permaneceram constantes até 60 dias, com posterior incremento dos valores ( $p\leq 0,05$ ).



**Figura 12:** Cor ( $b^*$ ) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2 - morango armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico,

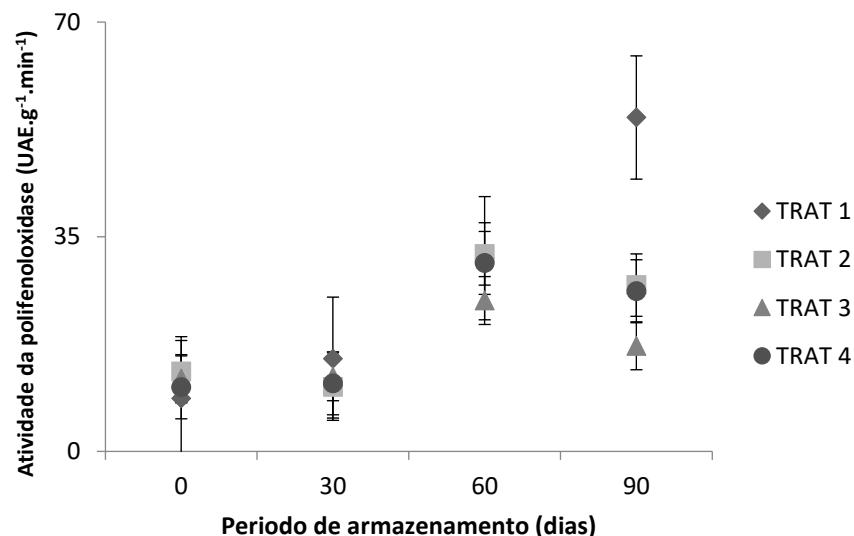
cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Os morangos submetidos aos tratamentos 4 apresentaram valores superiores ( $p\leq 0,05$ ) na coordenada  $b^*$  (coloração mais amarelada), em relação ao tratamento 1, em 90 dias de armazenamento (Apêndice J). Não houve diferença significativa nos valores de  $b^*$  dos morangos submetidos aos tratamentos 1, 2 e 3.

Valores superiores na coordenada  $b^*$  de morangos congelados foram relatados por Abd-Elhady (2014), nos tratamentos adicionados de ácido cítrico e lactato de cálcio, em relação ao controle.

## 6.9 Polifenoloxidase

Ao analisar os dados de atividade da enzima polifenoloxidase dos morangos congelados submetidos aos distintos tratamentos, pode-se observar que até 30 dias de armazenamento, houve manutenção dos valores ( $p\geq 0,05$ ), com posterior aumento significativo ( $p\leq 0,05$ ) em relação ao dia do processamento (ponto 0), conforme Figura 13.



**Figura 13:** Atividade da polifenoloxidase ( $\text{UAE} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

No início do armazenamento não se observou uma tendência clara sobre a influência dos tratamentos (Apêndice K), entretanto, ao término do armazenamento, os morangos submetidos ao tratamento 3 apresentaram os menores valores ( $p \leq 0,05$ ) de atividade da polifenoloxidase, possivelmente pela presença do ácido cítrico e ausência da gelatina, o que fez com que houvesse maior contato do antioxidante com os compostos fenólicos. Sugere-se que a gelatina no tratamento 4 tenha atuado como substrato da enzima em função da presença dos aminoácidos tirosina e fenilalanina (VAN VLIERBERGHE et al., 2014). Não houve diferença significativa na atividade da enzima nos morangos submetidos aos tratamentos 2 e 4. A maior atividade enzimática ( $p \leq 0,05$ ) foi observada nos morangos submetidos ao tratamento 1.

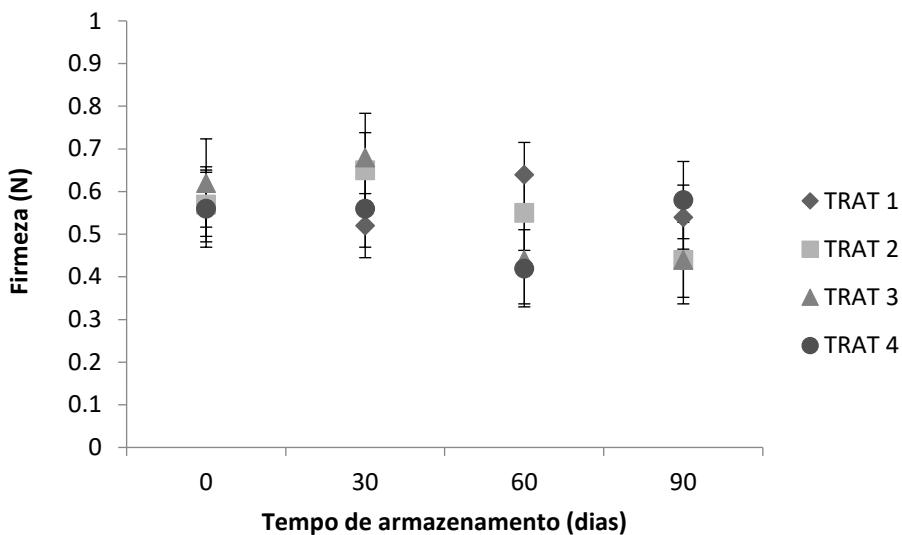
A enzima polifenoloxidase na presença de oxigênio oxida as antocianinas e os compostos fenólicos, ocasionando a formação da quinonas que levam ao escurecimento dos frutos (ABD-ELHADY, 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

O ácido cítrico tem sido utilizado como um agente anti-escurecimento por inibir a atividade da enzima polifenoloxidase (ABD-ELHADY, 2014).

De acordo com Sulaiman e Silva (2013), o congelamento de morangos a  $-18^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$  não afetou a atividade da enzima nas frutas descongeladas, pois embora a atividade da enzima seja retardada pela baixa temperatura, a funcionalidade da enzima pode ser totalmente recuperada quando as amostras são descongeladas.

## 6.10 Firmeza

De acordo com a Figura 14, apesar de oscilações nos valores de firmeza terem sido observadas durante o armazenamento congelado dos morangos, não houve distinção significativa entre os valores em relação ao tempo de armazenamento, assim como em função do tratamento ( $p \geq 0,05$ ) (Apêndice L), devido ao alto desvio padrão.



**Figura 14:** Firmeza (N) de morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

Normalmente observa-se redução da firmeza dos vegetais submetidos ao congelamento, causada pela perda de turgidez da célula devido à perfuração da membrana plasmática pelos cristais de gelo, além disso, o dano causado ocasiona a liberação de enzimas como pectinases e hemicelulases que durante o descongelamento também contribuem nesta alteração (JHA et al., 2019).

Diferentes estudos têm demonstrado redução da firmeza de morangos submetidos ao congelamento mesmo na presença de revestimentos e agentes de firmeza (HAN et al., 2004; GALETTO et al., 2010; YU; LIAO, 2016).

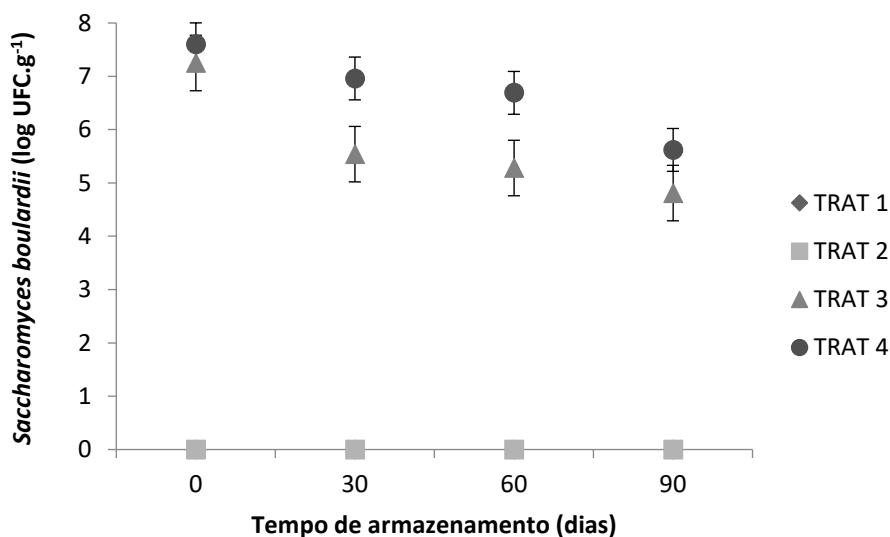
Por outro lado, Abd-Elhady (2014) observou aumento de até 69% da firmeza de morangos congelados a  $-40^{\circ}\text{C}$  e estocados a  $-18^{\circ}\text{C}$ , tratados com 0,4% de ácido cítrico e diferentes concentrações de lactato de cálcio.

Neste estudo, em função da variabilidade de firmeza das amostras os resultados não demonstraram a influência dos tratamentos.

## 6.12 Viabilidade da *Saccharomyces boulardii*

Pode-se observar que não houve crescimento da *Saccharomyces boulardii* durante os 90 dias de armazenamento nos morangos referentes aos

tratamentos 1 e 2. Nos tratamentos 3 e 4 houve redução significativa na contagem de fungos ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 15). Em relação aos tratamentos, durante todo o armazenamento, as contagens dos fungos nos morangos oriundos do tratamento 4 foram superiores as obtidas no tratamento 3 ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 15:** Viabilidade da *Saccharomyces boulardii*, expressa através da contagem de fungos ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ), em morangos congelados armazenados por 90 dias. Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico, cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ ; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$ . As barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%.

A quantidade mínima de probióticos viáveis que deve estar presente nos alimentos para transmitir benefícios à saúde varia, mas comumente a indústria de alimentos adota o nível recomendado  $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$  no momento do consumo (ALEGRE et al., 2011; BURGAIN et al., 2011). Assim, apenas os morangos submetidos ao tratamento 4 obtiveram este valor até 60 dias de armazenamento.

Parece que o revestimento de gelatina promoveu uma proteção a *Saccharomyces boulardii* frente às condições de congelamento. Possivelmente, em função da manutenção da atividade de água, visto que no tratamento 3 houve maior perda de exsudado e com isso redução da atividade de água e lixiviação dos nutrientes.

De acordo com Guimarães et al. (2018), filmes e revestimentos comestíveis se mostraram uma boa estratégia para carrear microrganismos

vivos, demonstrando uma melhoria na viabilidade do probiótico durante o tempo de armazenamento e processamento do produto alimentar.

O sucesso da incorporação de probióticos em matrizes alimentares é dependente de vários fatores, por exemplo, pH, temperatura, competição com outros microrganismos e inibidores, composição química do alimento (atividade de água, carbono, nitrogênio, mineral e oxigênio) (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Não foram encontrados estudos para comparação referente à adição de probióticos em vegetais congelados.

Salik e Arslaner (2020) demonstraram que o crescimento e a viabilidade de *Saccharomyces boulardii* em sorvetes é dependente da formulação. A adição de uma mistura de nozes, uva e sementes de uva estimulou o crescimento do microrganismo durante o armazenamento a -20 °C por 60 dias, alcançando no máximo 6,74 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Khodaei e Hamidi-Esfahani (2019) observaram que a viabilidade celular do *Lactobacillus plantarum* adicionado em morangos revestidos com carboximetilcelulose armazenados por 15 dias a 4 °C foi mantida em níveis altos e constantes, chegando a 8,40 log UFC.g<sup>-1</sup>.

## 7. Conclusão

O uso do revestimento de gelatina em morangos minimizou os efeitos do congelamento e promoveu a proteção da *Saccharomyces boulardii*, obtendo-se até 60 dias de armazenamento a concentração mínima viável do microrganismo para exercer a propriedade funcional e redução da perda de exsudado. Além disso, o revestimento de gelatina adicionado de ácido cítrico e cloreto de cálcio, em combinação com o congelamento a -18 °C, reduziu as reações metabólicas e exerceu um efeito de proteção aos compostos bioativos, sendo possível a sua utilização em substituição ao ultracongelamento, principalmente, para as agroindústrias que não disponham do equipamento. Por outro lado, na ausência da gelatina, a *Saccharomyces boulardii* influenciou negativamente nos parâmetros físico-químicos, além de mostrar menor viabilidade.

## Referências

- AABY, K.; MAZUR, S.; NES, A.; SKREDE, G. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ABD-ELHADY, M. Effect of citric acid, calcium lactate and low temperature prefreezing treatment on the quality of frozen strawberry. **Agricultural Science**, v. 59, n.1, p. 69-75, 2014.
- AITBOULAHSEN, M.; SAID, Z.; LAGLAOUI, A.; HICHAM C. Gelatin-based edible coating combined with *Mentha pulegium* essential oil as bioactive packaging for strawberries. **Journal of Food Quality**, v. 2018, p.1-7, 2018.
- ALEGRE, I.; VINAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**. v. 28, p.59-66, 2011.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, n.1, p.348-355, 2013.
- ANTUNES, L. E.; REISSER JÚNIOR, C.; SCHWENGBER, J. E. **Moranguero**. Brasília: Embrapa, 2016. 590p.
- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. DE. Revisão: coberturas protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014.
- ASSIS, O. B. G.; BRITO, D.; FORATO, L. A. **O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas in natura e minimamente processadas**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária. 2009. 23p.

BERBARI, S. A. G.; NOGUEIRA J. N.; CAMPOS, S. D. S. Efeito de diferentes tratamentos pré-congelamento sobre a qualidade do morango var. Chandler congelado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p. 82-86, 1998.

BESINELA JÚNIOR, E.; MONARIM, M. M. S.; CAMARGO, M.; MAHL, C. R. A.; SIMÕES, M. R.; SILVA, C. F. Efeito de diferentes biopolímeros no revestimento de mamão (*Carica papaya* L) minimamente processado. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 1, n. 1, p.131-142, 2010.

BRACKMANN, A.; FREITAS, S. T.; MELLO, A. M.; NEUWALD, D. A. Effect of storage temperature under the quality of 'Oso Grande' strawberry. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n. 1, p. 77-78, 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BILBAO-SAINZ, C.; SINROD, A.; POWELL-PALM, M. J. Preservation of sweet cherry by isochoric (constant volume) freezing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 108-115, 2019.

BRON, I. U.; JACOMINO, A. P. Classificação de frutos por "climatério" é conceito em extinção? **Visão Agrícola**, v. 7, p. 8-10, 2007.

BUGGENHOUT, S. V.; MESSAGIE, I.; MAES, V.; DUVETTER, T.; LOEY, A. V.; HENDRICKX. M. Minimizing texture loss of frozen strawberries: effect of infusion with pectinmethylesterase and calcium combined with different freezing conditions and effect of subsequent storage/thawing conditions. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 395-404, 2006.

BULUT, M.; BAYER, Ö.; KIRTL, E.; BAYINDIRLI, A. Effect of freezing rate and storage on the texture and quality parameters of strawberry and green bean

frozen in home type freezer. **International Journal of Refrigeration**, v. 88, p. 360-369, 2018.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.

CAMPELL-PLATT, G. **Food Science and Technology**. Barueri: Editora Manole. 2015. 548p.

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2003. 3p.

CANTILLANO, R. F. F.; DA SILVA, M. M. da S. **Manuseio pós-colheita de morangos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. p. 10-11.

CARELLE, A. C.; CÂNDIDO, C. C. **Tecnologia dos alimentos – Principais etapas da cadeia produtiva**. São José dos Campos: Editora Érica, 2014. 144p.

CEREZO, A. B.; CUEVAS, E.; WINTERHALTER, P.; GARCIAPIARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 574-582, 2010.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. Lavras: ESALFAEPE, 1990. 320p.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Films and edible coatings based on

native starches and gelatin in the conservation and sensory acceptance of Crimson grapes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba: FAO/WHO, 2001. 34p.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

GALETTI, C. D.; VERDINI, R. A.; ZORRILLA, S. E.; RUBIOLO, A. C. Freezing of strawberries by immersion in CaCl<sub>2</sub> solutions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 2, p.243-248, 2010.

GARCIA, J. M.; HERRERA, S.; MORILLA, A. Effects of postharvest dips in calcium chloride on strawberry. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 30-33. 1996.

GOMES, R. P. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 2007. 446p.

GUIMARÃES, A.; ABRUNHOSA, L.; PASTRANA, L. M.; CERQUEIRA, M. A. Edible films and coatings as carriers of living microorganisms: a new strategy towards biopreservation and healthier foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 594-614, 2018.

HAN, C.; ZHAO, Y.; LEONARD, S. W; TRABER, M. G. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria × ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 33, n. 1, p. 67-78, 2004.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, n.3, p. 205-229, 2003.

IAL- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.1020p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>. Acesso em: 25 de abril de 2020.

IM, E.; Pothoulakis, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34, p. S62-S70, 2010.

JHA, P. K.; XANTHAKIS, E.; CHEVALLIER, S.; JURY, V.; LE-BAIL, A. Assessment of freeze damage in fruits and vegetables. **Food Research International**, v. 121, p.479-496, 2018.

KAYS, J. S. **Postharvest physiology of perishable plant products.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 453 p.

KHODAEI, D.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 1-9, 2019.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos-teoria e aplicações práticas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242p.

LEE, J.; DURST, R. W.; WROLSTAD, R. E. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 5, p.1269–1278, 2005.

LICODIEDOFF, S.; KOSLOWSKI, L. A. D.; SCARTAZZINI, L.; MONTEIRO, A. R; NINOW, J. L; BORGES, C. D. Conservation of physalis by edible coating of gelatin and calcium chloride. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 4, p.1629-1634, 2016.

LOPES, T. R.; PINTO, M. A. O. Aplicação terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em diarreias: uma revisão. **HU Revista**, v. 36, n. 2, p. 107-122, 2010.

MANNUCCI, A.; SERRA, A.; REMORINI, D.; CASTAGNA, A.; MELE, M.; SCARTAZZA, A.; RANIERI, A. Aroma profile of Fuji apples treated with gelatin edible coating during their storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 28-36, 2017.

MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or black root. **Plant Cell and Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.

MATTIUZ, B. H.; DURIGAN, J. F. ROSSI JÚNIOR, O. D. Processamento mínimo em goiabas ‘Paluma’ e ‘Pedro Sato’. 2. Avaliação química, sensorial e microbiológica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 409-413, 2003.

NUNES, G.; NOVELLO, D. Ação antioxidante e propriedades funcionais do morango no organismo humano. **Revista Valore**, v. 5, n. 5004, p. 1-23, 2020.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Editora Manole, 2006. 632p.

OLIVEIRA, A.; COELHO, M.; ALEXANDRE, E.M.C.; ALMEIDA, D. P. F.; PINTADO, M. Long-term frozen storage and pasteurization effects on strawberry polyphenols content. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, p. 1838–1844, 2015.

OLIVEIRA, P. M. de; LEITE JÚNIOR, B. R de C.; MARTINS, M. L.; FURTADO, E. M.; RAMOS, A. M. Minimally processed yellow melon enriched with probiotic bacteria. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 2415-2426, 2014.

OSZMIAŃSKI, A. J.; WOJDYŁO, A.; KOLNIAK, J. Efeito do tratamento com ácido L-ascórbico, açúcar, pectina e congelamento-descongelamento no

conteúdo de polifenóis de morangos congelados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 42, n. 2 , p. 581-586, 2009.

PARDO, S.; GALVAGNO, M. Á.; CERRUTTI, P. Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del preacondicionamiento fisiológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 2, p.155-160, 2009.

PEREIRA, F. do A.; ANDRADE, L. M.; FORTALEZA, J. M. **Coleção plantar: a cultura do morango**. Brasília: Embrapa, 2011. 51p.

PEREIRA, E. M. **Conservação de goiaba vermelha “Pedro Sato” pelo uso de recobrimento à base de quitosana e gelatina pela técnica layer-by-layer**. 2019. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização (Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

PRASANNA, V.; PRABHA, T. N.; THARANATHAN, R. N. Fenômenos de amadurecimento de frutas - Uma visão geral. **Revisões Críticas em Ciência e Nutrição de Alimentos**, v. 47, p. 1-19, 2007.

QUINATO, E. E.; DEGÁSPARI, C. H.; VILELA, R. M. Aspectos nutricionais e funcionais do Morango. **Visão Acadêmica**, v.8, n.1, p 11-17, 2007.

RADI, M.; FIROUZI, E.; ZARE, N.; AKHAVAN, H.; AMIRI, S. Effect of gelatin-based edible coatings incorporated with *aloe vera* and black and green tea extracts on the shelf life of fresh-cut oranges. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p.1-10, 2017.

RENO, J. M; PRADO, M. E. T; DE RESENDE, J. V. Microstructural changes of frozen strawberries submitted to pre-treatments with additives and vacuum impregnation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 1, n. 31, p. 247-256, 2011.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p.1-11, 2010.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

RÖßLE, C.; AUTY, A.E. M; BRUNTON, N.; GORMLEY, R. T.; BUTLER, F. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 203–209, 2010.

RUSSO, P.; CHIARA, M. L. V.; VERNILE, A.; AMODIO, M. L.; ARENA, M. P; CAPOZZI, V.; MASSA, S.; SPANO, G. Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

SAHARI, M. A.; BOOSTANI, F. M.; ZOHREH HAMIDI, E. Z. Effect of low temperature on the ascorbic acid content and quality characteristics of frozen strawberry. **Food Chemistry**, V. 86, n. 3, p.357-363, 2004.

SALIK, M. A.; ARSLANER, A. The quality characteristics and shelf life of probiotic ice cream produced with Saruç and *Saccharomyces boulardii*. **International Food Research Journal**, v. 27, n. 2, p.234-244, 2020.

SHIGEMATSU, E.; DORTA, C.; RODRIGUES, F. J.; CEDRAN, M. F.; GIANNONI, J. A.; OSHIIWA, M.; MAURO, M. A. Edible coating with probiotic as a quality factor for minimally processed carrots. **Journal Food Science and Technology**, n. 9, v. 55, p. 3712–3720, 2018.

SILVA, J. A. **Tópicos em ciência e tecnologia de alimentos**. Editora: Livraria Varela, 2000. 664p.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SPERANZA, B.; CAMPANELLO, D.; BEVILACQUA, A.; ALTIERI, C.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Viability of *Lactobacillus plantarum* on fresh-cut chitosan and alginate-coated apple and melon pieces. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p.1-8, 2018.

STATISTIX 10. Disponível em: <http://www.statistix.com/free-trial/>. Acesso em: agosto, 2020.

SULAIMAN, A.; SILVA, F. V. M. High pressure processing, thermal processing and freezing of 'Camarosa' strawberry for the inactivation of polyphenoloxidase and control of Browning. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 424-428, 2013.

SUUTARINEN, J.; HEISKA, K.; MOSS, P.; AUTIO, K. The effects of calcium chloride and sucrose prefreezing treatments on the structure of strawberry tissues. **Food Science and Technology**, v. 33, n.2, p. 89-102, 2000.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. Universidade Estadual de Campinas. 4 ed, 2011.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733–749, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TURMANIDZE, T.; JGENTI, M.; GULUA, L.; SHAIASHVILI, V. Effect of ascorbic acid treatment on some quality parameters of frozen strawberry and raspberry fruits. **Annals of Agrarian Science**, v. 30, p. 1-5, 2017.

TZOUUMAKI, M.V., BILIADERIS, C.G., VASILAKAKIS, M. Impact of edible coatings and packaging on quality of white asparagus (*Asparagus officinalis L.*) during cold storage. **Food Chemistry**, v. 117, p. 55–63, 2009.

VANDENPLAS, Y.; BRUNSER, O.; SZAJEWSKA, H. *Saccharomyces boulardii* in childhood. **European Journal of Pediatrics**, v. 168, p.253–265, 2009.

VAN VLIERBERGHE, S.; GRAULUS, G. J.; KESHARI SAMALL, S.; VAN NIEUWENHOVE, I. DUBRUET, P. Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. In: NETTI, P. A. **Biomedical foams for tissue engineering applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, p. 335-390, 2014.

VILLADIEGO, A. M. D.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; PUSCHMANN, R.; MINIM, V. P. R.; CRUZ, R. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v. 52, n. 300, p. 221-244, 2005.

YAMAMOTO, E. L. M.; FERREIRA, R. M. R.; FERNANDES, P. L. M.; ALVEZ, L. B. A. E. O. Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal de frutos. **Revista Verde**, v. 6, n. 2, p. 49 – 55, 2011.

YU, A.; LIAO, H. Evaluation of three-step pretreatment combined with air blast or cryomechanical freezing in improving the quality of frozen strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Harunoka). **International Journal of Food Engineering**, v. 12, n. 2, p.153–163, 2016.

## **Apêndices**

**Apêndice A.** Perda de exsudado (%) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	-	19,55±3,03 A	19,50±1,59 B	15,56±3,52 BC
2	-	5,50±2,51 B	6,52±1,13 C	5,42±2,35 C
3	-	18,49±4,79 A	38,62±2,05 A	39,75±6,84 A
4	-	5,02±0,49 B	9,05±1,87 C	21,36±4,38 B

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice B.** Acidez titulável (%) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	0,93±0,02 A	0,93±0,00 A	0,78±0,00 B	0,81±0,02 AB
2	1,02±0,008 A	0,90±0,03 A	0,84±0,00 AB	0,75±0,07 B
3	0,99±0,07 A	1,06±0,09 A	0,95±0,06 A	0,85±0,04 AB
4	1,05±0,07 A	1,06±0,09 A	0,92±0,02 A	0,97±0,07 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice C.** Sólidos solúveis (ºBrix) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	5,03±0,00 B	4,83±0,62 AB	4,66±0,47 AB	5,33±0,24 A
2	5,00±0,00 B	4,50±0,00 B	3,83±0,62 B	4,67±0,47 AB
3	5,00±0,00 B	4,50±0,00 B	4,5±0,00 B	5,0±0,00 A
4	6,17±0,47 A	5,5±0,00 A	5,5±0,00 A	3,83±0,24 B

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice D.** Teor de Vitamina C (mg.100 g<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	36,34±2,28 A	35,95±3,48 A	20,50±0,53 B	24,70±1,51 B
2	34,77±0,71 A	28,49±1,99 AB	30,66±0,90 A	31,29±0,46 A
3	32,83±1,83 A	27,19±2,05 B	32,46±1,28 A	30,13±1,08 A
4	33,35±1,38 A	32,14±1,75 AB	32,97±0,87 A	31,40±0,75 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice E.** Compostos fenólicos totais (mg equivalente a ácido gálico.100g<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	320,69±0,98 A	317,51±0,41 C	317,01±0,00 AB	336,31±0,83 B
2	316,34±0,86 A	313,13±2,70 D	316,02±0,23 B	334,82±1,54 B
3	324,21±1,66 A	322,57±0,41 B	317,01±0,48 AB	333,47±1,28 B
4	328,98±7,94 A	329,32±0,24 A	317,01±0,41 AB	343,99±0,24 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice F.** Antocianinas (mg de perlagonidina-3-glucosideo equivalente.100g<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	58,37±0,83 D	59,79±1,73 C	63,01±0,00 B	51,61±3,98 C
2	76,16±0,55 A	63,72±0,09 B	47,74±0,15 C	75,13±0,25 B
3	66,37±1,10 C	78,16±1,01 A	65,05±1,23B	55,92±0,40 C
4	71,62±0,99 B	79,19±0,48 A	83,12±0,83 A	95,81±3,39 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice G.** Atividade antioxidante (% de inibição) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	92,35±0,23 A	79,11±0,69 B	89,77±1,07 AB	92,14±0,22 A
2	93,03±0,25 A	87,91±1,22 A	89,90±0,47 A	88,96±0,96 C
3	93,05±0,33 A	86,80±1,42 A	89,52±0,47 AB	91,10±0,41 AB
4	91,44±0,28 B	86,25±0,00 A	87,37±0,90 B	89,82±0,30 BC

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice H.** Cor (L\*) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	32,68±1,38 A	36,93±2,84 A	34,40±1,98 A	33,08±2,15 A
2	33,71±0,53 A	33,92±0,79 A	35,47±1,25 A	33,89±2,91 A
3	32,82±0,61 A	40,30±4,79 A	31,71±1,56 A	31,61±1,19 A
4	34,48±2,41 A	34,55±0,76 A	32,69±1,41 A	36,48±0,50 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados

de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice I.** Cor (a\*) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	30,13±0,68 A	31,01±0,64 A	26,75±1,04 A	29,4±0,36 B
2	26,70±0,30 A	32,46±0,16 A	30,95±0,33 A	32,33±2,63 AB
3	28,71±1,97 A	29,67±1,58 A	28,30±2,76 A	33,78±0,51 A
4	28,49±2,55 A	31,86±0,58 A	26,00±0,84 A	34,14±1,05 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice J.** Cor (b\*) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	15,50±0,26 A	19,50±3,48 A	18,75±2,35 A	15,81±2,19 B
2	16,24±1,93 A	18,42±1,12 A	21,19±0,68 A	19,79±3,62 AB
3	15,43±2,11 A	24,06±5,41 A	15,57±3,13 A	19,30±0,91 AB
4	18,51±2,38 A	18,64±2,34 A	15,7±1,48 A	23,93±1,62 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice K.** Atividade das enzimas polifenoloxidases (UAE.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	8,66±0,98 B	15,11±0,95 A	31,50±0,70 A	54,44±3,57 A
2	13,00±1,63 A	10,53±0,41 B	32,20±1,35 A	27,11±3,57 B
3	11,87±0,65 AB	12,17±0,42 B	24,60±1,67 B	17,22±3,60 C
4	10,44±0,31 AB	11,10±0,14 B	30,73±1,52 AB	26,11±2,00 B

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice L.** Firmeza (N) de morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	0,57±0,29 A	0,51±0,09 A	0,64±0,11 A	0,54±0,24 A
2	0,57±0,29 A	0,65±0,14 A	0,55±0,29 A	0,56±0,10 A
3	0,62±0,11 A	0,68±0,32 A	0,44±0,05 A	0,44±0,29 A
4	0,56±0,10 A	0,56±0,22 A	0,42±0,07 A	0,58±0,07 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados

de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.

**Apêndice M.** Viabilidade da *Saccharomyces boulardii*, expressa através da contagem de fungos ( $\log \text{UFC.g}^{-1}$ ), em morangos congelados armazenados por 90 dias.

Tratamento	Armazenamento (dias)			
	0	30	60	90
1	0,00±0,00 C	0,00±0,00 C	0,00±0,00 C	0,00±0,00 C
2	0,00±0,00 C	0,00±0,00 C	0,00±0,00 C	0,00±0,00 C
3	7,25±0,02 B	5,54±0,01 B	5,28±0,03 B	4,81±0,20 B
4	7,60±0,01 A	6,96±0,02 A	6,69±0,00 A	5,62±0,05 A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ( $p\geq 0,05$ ). Tratamento 1: Controle 1 - morango armazenado a -18 °C; Tratamento 2: Controle 2 - morango armazenado a -80 °C; Tratamento 3: morangos adicionados de ácido cítrico cloreto de cálcio e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C; Tratamento 4: morangos adicionados de gelatina, ácido cítrico, cloreto de cálcio, glicerol e *Saccharomyces boulardii*, armazenados a -18 °C.